

Die Messung von Extrazellulärspiegeln des
cyclischen Adenosin- 3' - 5' - monophosphats (cAMP)

Methodik und Anwendung

Fritz Jänicke

1976



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aus dem Klinisch Chemischen Institut des Städt. Krankenhauses
München Schwabing

Direktor: Prof. Dr. O. Wieland

Die Messung von Extrazellulärspiegeln des
cyclischen Adenosin- 3' - 5' - monophosphats (cAMP)

Methodik und Anwendung

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
an der Ludwig Maximilians-Universität zu München



vorgelegt von
Fritz Jänicke
aus Berlin

Jahr
1976

Mit Genehmigung des Fachbereichs Medizin der Universität München

Berichterstatter:	Prof. Dr. O. Wieland
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. H. Mehnert
Dekan:	Prof. Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 9. 11. 1976



Meinem verstorbenen Vater
Meiner Mutter
Der Geduld meiner Frau Brigitte

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
I. Einleitung	
Second messenger Prinzip	1
II. Frühere Untersuchungen über extrazelluläres cAMP	8
1. Veränderungen der extrazellulären cyclischen Nucleotide durch exogene Hormongaben	8
2. Kinetik der extrazellulären Nucleotidspiegel	13
3. Normwerte extrazellulärer Konzentrationen der cyclischen Nucleotide	15
4. Vergleich verschiedener Meßmethoden für cyclische Nucleotide	18
III. Eigene Untersuchungen	23
A) Methodischer Teil	23
1. Präparation von cAMP-Bindungsprotein aus Rinderherzmuskel	23
2. Bestimmung von cAMP mit der modifizierten Methode nach Gilman	30
3. Graphische Darstellung und Auswertung der Eichkurven	34
4. Vergleich der Kohle-Dextran-Methode oder der Sepharosekopplung mit der Filtermethode	37
5. Probenaufbereitung zur Bestimmung der Extrazellulärkonzentrationen von cAMP mit der Proteinbindungsmethode	43
6. Faktoren im menschlichen Blutserum, die die Bindungskapazität des cAMP-Proteinkinase-Systems verändern	47
7. Standardisierung der Serummessungen mit partiell gereinigtem Bindungsprotein	57
8. Erstellung von Normalwerten für cAMP in Serum und Urin	64

B) Klinischer Teil

65

1. Untersuchung über Plasmakonzentration und renale Ausscheidung von cAMP bei chronischen Hämodialysepatienten

65

2. Verhalten von cAMP und anderen Parametern in Plasma und Urin nach Gabe von Parathormon

72

IV. Zusammenfassung

V. Anhang

VI. Literaturverzeichnis

VII. Danksagung

VIII. Lebenslauf

I. Einleitung

Second messenger Prinzip

Hormone sind in vielzellige Organismen als extrazelluläre Informationübermittler in der Funktionshierarchie der Zellen und Gewebe von entscheidender Bedeutung und lange bekannt.

Dennoch ist es bis heute schwierig oder unmöglich, die Erklärung für die oft sehr verschiedenartigen Wirkungen eines Hormons auf den Stoffwechsel eines Zellsystems oder des Organismus auf einen gemeinsamen Nenner zu bringen.

Schematisch gesehen liegt der Kontrollfunktion der Hormone ein Regelvorgang zwischen übergeordneter und untergeordneter innersekretorischer Drüse bzw. dem Zielorgan oder Gewebe zugrunde. Auf dem extrazellulären Wege erreicht das Hormon als Träger einer Information seinen Wirkungsort, bewirkt daselbst durch Übertragung seiner Information eine Änderung des Stoffwechsels und wird dann metabolisiert und ausgeschieden. Die Geschwindigkeit der Konzentrationsänderung des Hormons bzw. die im Organismus bewirkte Änderung des Stoffwechsels kann auf dem Wege der Rückkoppelung als Stimulus oder Hemmung auf die erneute Sekretion wirken.

Unbekannt war bisher jedoch der molekulare Mechanismus der Übersetzung dieser Hormonsignale in Effekte des Zellstoffwechsels. Erstens liegen Hormone in der Extrazellulärflüssigkeit in äußerst niedriger Konzentration vor (10^{-11} Mol/l für Peptidhormone, für Catecholamine ist sie höher) und zum zweiten stellt die Zellmembran für viele Hormone ein erhebliches Hindernis dar, da selbst Moleküle von der Grössenordnung der Glucose die meisten Zell-

membranen nicht mehr frei passieren können. Bereits 1949 wurde jedoch ein Hormoneffekt des Insulins von der Zellwand her erklärt. Levin und Mitarbeiter (1) wiesen nach, daß Insulin die den Umsatz limitierende Membranpermeabilität für Zucker erhöht. Insulin kann also von der Zellmembran aus Einfluß auf den Glucoseumsatz in der Zelle nehmen, es ist nicht erforderlich, daß es selbst in die Zelle eindringt.

Tieferen Einblick in den molekularen Mechanismus der Informationsübertragung von extra- nach intrazellulär ermöglichte die Entdeckung des cyclischen Adenosin -3'-5'-monophosphat (cAMP) durch die Gruppe um E.W. Sutherland (2) 1958. Sie fanden, daß der Aktivierung der Glykogenolyse durch Adrenalin und Glucagon im Lebergewebe die intrazelluläre Bildung des cAMP vorausgeht. Es folgte eine große Zahl ähnlicher Befunde mit anderen Hormonen: sie alle beeinflussen den intrazellulären Spiegel von cAMP, bevor ihre hormontypische Wirkung nachweisbar wird.

Auf dieser Entdeckung, die der Schlüssel zu einer neuen Ära der Erforschung der Hormonregulation wurde, beruht die in der Zwischenzeit immer deutlicher belegte Hypothese, die dieser Substanz eine Funktion als "second messenger", einer Reihe von Proteohormonen und biogenen Aminen zuschreibt.

Für eine Reihe von Hormonen ist der in Abbildung 1 gezeigte Mechanismus anerkannt.

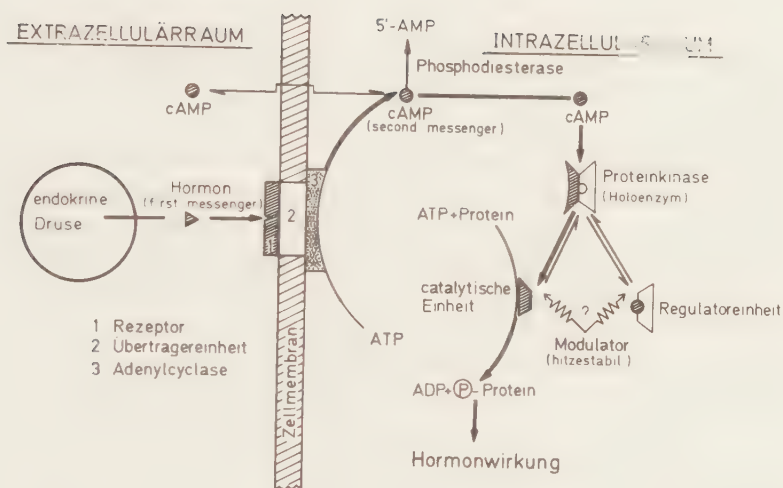


Abb. 1

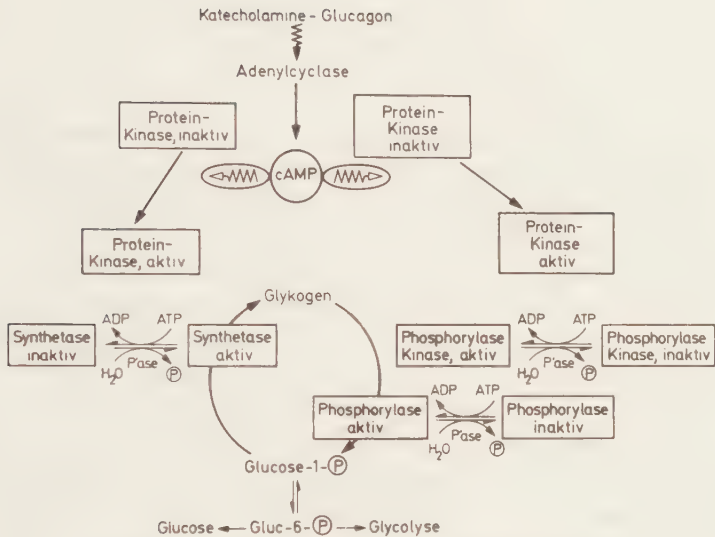
Mechanismus der durch cAMP vermittelten Hormonwirkungen im Sinne des second messenger Modells

Das vom ersten Sendboten - dem Hormon - an die Erfolgszelle zu übermittelnde Signal wird von einem spezifischen Empfänger - dem Hormonrezeptor - an der Außenseite der Zellmembran aufgenommen und über eine Übertragereinheit (möglicherweise durch allosterische Konformationsänderung) auf ein an der Innenseite der Membran gelegenes Enzymsystem - die Adenylatcyclase - übermittelt. Durch die Bindung des Hormonmoleküls wird auf diesem Wege die Adenylatcyclase aktiviert, die in der Anwesenheit von Mg^{+2} das α -ständige Phosphat im ATP unter Abspaltung von Pyrophosphat zum Ring am C-Atom 3 der Ribose schließt. Die Entdeckung cAMP-sensitiver Proteinkinasen in vielen Geweben erweiterte die angelegte Hypothese. Proteinkinasen phosphorylieren andere, potentiell katalytisch aktive Proteine mit ATP, wodurch diese aktiviert oder auch inhibiert werden können. Der hormoninduzierte

Anstieg der intrazellulären cAMP-Konzentration bewirkt über eine Bindung des cAMP an die Regulator- oder Bindungseinheit der Proteinkinase eine Abdissoziation der katalytischen Einheit, die die eigentliche Phosphorylierungsreaktion erst jetzt katalysieren kann. Auf diese Weise wird das spezifische Erfolgsprotein durch die Phosphorylierung gemäß dem Signal des jeweiligen Hormons in seiner physiologischen Eigenschaft verändert und bewirkt Änderungen des Zellstoffwechsels. Die Bindung des cAMP an die Regulatoreinheit und die Aktivität der katalytischen Einheit werden nach neueren Untersuchungen (3 - 8) auf bisher noch unbekannte Weise durch ein hitzestabiles "Modulatorprotein" beeinflusst. Am besten untersucht ist dieses System am Beispiel der Glykogen auf- und abbauenden Enzyme, Glykogen Synthetase und Phosphorylase.

cAMP aktiviert in der Leber eine spezifische Proteinkinase, die Phosphorylase-Kinase, die ihrerseits durch Übertragung eines Phosphatrestes aus ATP die inaktive Phosphorylase b in die aktive Phosphorylase a überführt und so den hormoninduzierten (z.B. durch Glukagon) Glykogenabbau einleitet.

Im Gegensatz zum Phosphorylasesystem ist die aktive Form der Glykogensynthetase dephosphoryliert. Das Schlüsselenzym für die Glykogensynthese wird also durch Phosphorylierung inaktiviert, während das für den Abbau verantwortliche Enzym durch den gleichen Vorgang aktiviert wird. Durch die Wirkung eines einzigen Enzyms wird also der Glykogenstoffwechsel an beiden Schlüsselenzymen gesteuert.



Die Kontrolle des Glykogenstoffwechsels durch Cyclo-AMP

Abb. 2

Ähnliche Steuerungen der Enzymaktivitäten wurden auf anderen Stoffwechselwegen nachgewiesen und zum Teil bereits recht gut belegt; so die Steuerung des Embden-Meyerhoffweges an der Stelle der Phosphofructokinase (PFK) und der Fructose -1-6-Diphosphotase (9). Ebenso werden cAMP abhängige Regulationsvorgänge der Enzyme Pyruvatkinase und Triglyceridlipase vermutet, um nur einige Beispiele zu nennen.

Der intrazelluläre Spiegel an cAMP unterliegt einem Regelsystem durch folgende Faktoren:

1) "Syntheseenzym Adenylatcyclase"

2) "Abbauprotein Phosphodiesterase"



So besteht sowohl in der Beeinflussung der Bildung als auch der Geschwindigkeit des Abbaus von cAMP zu 5'-AMP eine Möglichkeit der Regulation des cAMP-Spiegels in der Zelle.

- 3) "Bindung des cAMP an Regulatoreinheit der Proteinkinase"
So gebundenes cAMP ist durch Phosphodiesterase nicht angreifbar.
- 4) "Abbau in noch nicht identifizierbaren Abbauebenen" (10,11)
(Die Reversibilität der Reaktion $3'-5'-\text{cAMP} + \text{PP} \rightarrow \text{ATP}$ ist bisher noch nicht erwiesen, obwohl sie thermodynamisch denkbar wäre!)
- 5) "Beschleunigter Efflux in den Extrazellulärraum"

Obwohl für das polar gebaute Molekül eine Permeabilität der Membranen nur in geringem Ausmaß besteht, wird zumindest für einige Gewebe eine erleichterte Transport diskutiert. (12)

Die Vorteile der Zwischenschaltung eines "second messengers" in die Kette der Hormonwirkung ist erkennbar. Die Hormone wirken von der Zellmembran aus, sie müssen nicht die Membranbarriere überwinden. Weiterhin wird der Spiegel an cAMP durch die Zahl der oben genannten Angriffsmöglichkeiten besser regulierbar, d.h. Hormonwirkungen können sich verstärken oder hemmen oder Einflüsse verschiedener Art können den Weg von Hormonbindung bis zur Veränderung des katalytisch aktiven Zielproteins auf jeder Stufe modifizieren. Schließlich liegt die Bedeutung in einer außerordentlichen Verstärkung des hormonellen Eingangssignals durch noch sehr geringe Hormonkonzentration im Extrazellulärraum, da die Bindung eines einzigen Hormonmoleküls

am Receptor den Impuls zur Bildung eines Vielfachen an cAMP-Molekülen geben kann.

Die Uniformität dieser gemeinsamen Endstrecke vieler Hormonwirkungen steht nicht im Widerspruch zur Vielzahl hormoneller Wirkungen:

Die Spezifität der Rezeptoren der Adenylatcyclase für die verschiedenen Hormone ist hoch und deren Verteilungsmuster von Gewebe zu Gewebe verschieden und zum Teil organspezifisch. So wird in der Leber eine Glucagon- und eine Adrenalin-spezifische Adenylatcyclase angenommen (13,14). Andererseits ist für bestimmte Gewebe die Existenz von nur einer Adenylatcyclase mit mehreren verschiedenen Rezeptoren wahrscheinlich (15). Weiterhin wurden in verschiedenen Geweben Proteinkinasen mit unterschiedlichen Eigenschaften gefunden und es ist zu vermuten, daß Enzym und Substratmuster von Gewebe zu Gewebe variieren. Auch die Phosphodiesterase, die bisher überwiegend im Cytoplasma in löslicher Form gefunden wurde, scheint in organspezifischen Isoenzymen vorzuliegen.

Die Rolle des zweiten in der Natur vorkommenden cyclischen Nukleotids des cyclischen Guanosin -3'-5'-monophosphats (cGMP) ist noch weitgehend unklar. Es wurden bereits Guanylatcyclasen isoliert, die im Gegensatz zu Adenylatcyclasen aber nicht durch Fluorid und Hormone stimulierbar waren.⁽⁹⁴⁻⁹⁷⁾ Auch cGMP-abhängige Proteinkinasen verschiedener Spezifität wurden gefunden (besonders in Arthropoden), deren Substrat ist jedoch unbekannt.

Die Beobachtung, daß durch Acetylcholin und Isoproterenol Veränderungen der cGMP-Konzentration im Herzmuskel auftreten (16), und daß hohe Dosen von Parathormon neben einer

erhöhten cAMP-Ausscheidung im Urin auch zu einer Ausscheidungssteigerung von cGMP führten (17), weisen auf eine mögliche Beteiligung von cGMP an Hormonwirkungen hin.

II. Frühere Untersuchungen über extrazelluläres cAMP

1. Veränderung der extrazellulären cyclischen Nukleotide durch exogene Hormongaben

Seit es Butcher und Sutherland (18) 1962 erstmals gelang, cAMP im Urin nachzuweisen, wurden eine Anzahl von Untersuchungen unternommen, den Zusammenhang zwischen hormoninduzierten Veränderungen der intrazellulären Nucleotidspiegel und deren Vorkommen in den Extrazellulärflüssigkeiten zu erhellen. 1967 beschrieben Chase und Aurbach (19) bei der Ratte die Stimulierung der cAMP-Ausscheidung im Urin durch Gabe von Parathormon. Die Befunde sind mittlerweile auch für den Menschen bestätigt (17, 20 - 23). Parathormongabe bedingt einen dosisabhängigen Anstieg der cAMP-Ausscheidung und des Plasma-cAMP-Spiegels sowie in geringerem Maße auch der cGMP-Ausscheidung. Begleitend, wenn auch verzögert, kommt es zum Anstieg der Phosphatelimination, wobei die Phosphatausscheidung bereits bei niedrigen Dosen ein Maximum zeigt, während die cAMP-Exkretion dosisabhängig weiter steigt. Dies würde bedeuten, daß der limitierende Faktor der phosphaturischen Wirkung einige Schritte hinter der Bildung des cAMP zu suchen wäre (17).

Dieselbe Wirkung wie durch Parathormon wurde durch eine EDTA induzierte Hypocalcämie erreicht, die den adäquaten Stimulus für die Sekretion des Hormons darstellt. Die Quel-

le der durch Parathormon erhöhten cAMP-Ausscheidung auf das 15-20 fache liegt in der Niere selbst, wo das Produkt der im proximalen Tubulus gelegenen Cyclase direkt von den Tubuluszellen in das Harnwegssystem abgegeben wird. Da unter Basalbedingungen das Verhältnis der Clearances cAMP : Inulin ungefähr 1,5 beträgt, werden $\frac{2}{3}$ des ausgeschiedenen Nucleotids dem Blut durch glomeruläre Filtration entnommen, während $\frac{1}{3}$, je nach Parathormonspiegel, direkt der lokalen Hormonwirkung an der Niere entsprechen.

Da das Clearance-Verhältnis cAMP : Inulin nach Calciuminfusionen, die den durch Parathormon bedingten Anteil des Urin-cAMP durch Hemmung der Hormonsekretion - radioimmunologisch bestätigt (20) - supprimieren, nicht den Wert 1 erreicht, ist es wahrscheinlich, daß neben Parathormon noch andere die cAMP-Ausscheidung stimulierende Hormone direkt an der Niere angreifen (17).

Thyreocalcitonin, das in Bezug auf den phosphaturischen Effekt am proximalen Tubulus zu Parathormon synergistisch wirkt, hatte selbst bei einem parathyreoidektomierten Patienten, dessen Calciumspiegel durch exogene Zufuhr von Calcium normalisiert wurden, keinen Effekt auf die cAMP- und cGMP-Ausscheidung (17,24).

In partikulären Präparationen aus Rattennieren jedoch wurde in der Nierenrinde ebenfalls eine, wenn auch geringe, Aktivierung der Adenylatcyclase durch Thyreocalcitonin.

Über den Anteil des Adiuretins (Vasopressin), dessen Funktion in einer cAMP vermittelten Steigerung der Wasserpermeabilität der distalen Tubuli und Sammelrohre be-

steht (25), an der cAMP-Ausscheidung sind die Angaben widersprüchlich.

Während von einzelnen Autoren deutliche Anstiege der cAMP-Ausscheidung nach - allerdings sehr hohen - Dosierungen angegeben wurden (22, 26), konnten andere diese Befunde nicht bestätigen (17, 20). Der Ursprung des bei Parathormongabe dosisabhängig ansteigenden Serumspiegels an cAMP liegt ebenfalls in der Niere, obwohl noch andere Gewebe, wie Knochen und Darmtrakt, Erfolgsorgane des Hormons sind und in ihnen ein intrazellulärer Anstieg an cAMP nach Hormonstimulation nachgewiesen wurde. Der Nachweis wurde durch den fehlenden Anstieg des Serum-cAMP-Spiegels auf hohe Dosen von Parathormon bei Nephrektomierten erbracht (17).

Die stärksten Erhöhungen von cAMP sowohl im Plasma als auch im Urin wurden bei Verabreichung von Glukagon registriert (27, 23). Sekundäre Wirkungen von Parathormon, Catecholaminen und Hyperglykämie als auch Hyperinsulinämie als Reaktion auf die hohen Glukagondosen wurden ausgeschlossen. Obwohl Glukagon die cAMP-Bildung in der Leber, im Herzmuskel, Fettgewebe und langerhansschen Inseln stimuliert, wurde die Leber als alleinige Quelle des extrazellulären Nucleotids identifiziert. Dies gelang nach Glukagongabe vor und nach Hepatektomie beim Hund und durch Leberperfusionsversuche (27). Die Kurven von Plasma und Urinausscheidung liefen zeitlich parallel. Die Zunahme des Plasma-cAMP war also Ursache der erhöhten Urinausscheidung. Der nephrogene Anteil der cAMP-Ausscheidung war vernachlässigbar klein im Vergleich zur glomerulär filtrierte Menge und die Clearance von cAMP näherte sich derjenigen von Inulin, ganz im Gegensatz zur Parathormonwirkung (27). Über die Wirkung auf das Verhalten von cGMP

nach Glukagongabe sind die Angaben unterschiedlich. Williams et.al. (23) konnten nach Glukagon eine deutliche Erhöhung der cGMP-Ausscheidung feststellen, während Broadus et.al. (27) dies nicht nachwiesen.

Ähnlich widersprüchlich sind die Angaben über das Verhalten von cGMP nach Gabe von Catecholaminen. Ball et.al. (28) fanden in der Reihe der Catecholamine mit Zunahme der α -adrenergen-Komponente eine Erhöhung von Plasma- und Urin-cGMP, die sich durch gleichzeitige Gabe von β -Blockern verstärken, durch Gabe eines α -Blockers hemmen ließ, wohingegen das β -adrenerge Isoproterenol ohne Wirkung auf cGMP blieb. Williams (23) dagegen fand nach Isoproterenol eine stärkere Steigerung der Urinausscheidung von cGMP als von cAMP.

Das Verhalten von cAMP nach Catecholamingabe wird einheitlich beurteilt. Ball et.al. (28), beobachteten deutliche Anstiege von Plasma- und Urin-cAMP unter Isoproterenol wie auch Epinephrin zusammen mit dem α -Blocker Phentolamin, die nach β -Blockade nicht mehr nachweisbar waren, und somit als β -adrenerger Effekt einzuordnen sind, α - und β -adrenerge Wirkung erhöhten die Gesamt-cAMP-Ausscheidung in Urin um maximal 50 %, senkten dabei jedoch die glomeruläre Filtrationsrate.

Der α -adrenerge Stimulus bewirkte eine Erhöhung des nephrogenen Anteils am cAMP, der β -adrenerge dagegen eine Verminderung desselben trotz gleichzeitig erhöhten Plasma-cAMP, die cAMP-Clearance fiel bis auf Werte nahe der Inulin-Clearance. Ob der α -adrenerge Stimulus eine Direktwirkung auf die cGMP-Plasmakonzentration und Urinausscheidung darstellt oder ob vielleicht Sekundärwirkungen des Parasympathicus über Acetylcholin eine Rolle spielen, ist

noch unklar (16, 28, 29).

Beck, Reed et.al. (30) untersuchten an Hundenieren die Wirkung von α - und β -adrenergen Stimuli auf die Bildung von cAMP im Gewebe. Dabei blieben α -adrenerge Stimuli ohne Effekt, während β -adrenerge Substanzen die cAMP-Bildung beschleunigten. Diese Beobachtung stimmt mit den physiologischen Effekten der Antidiurese durch β -adrenerge und der Diurese durch α -adrenerge Substanzen überein, da ja cAMP die Wasserpermeabilität der distalen Tubuli und Sammelrohre erhöht (25), und so zur Antidiurese führt. Zusätzlich wurde eine Hemmung des ADH^{*}-Effekts auf die cAMP-Bildung im Nierenmark durch α -adrenerge Stimuli nachgewiesen.

Insulin, dessen senkende Wirkung auf den intrazellulären Spiegel an cAMP in einigen Organen beschrieben ist (4), hat keinen Einfluß auf die Plasmakonzentration des cyclischen Nucleotids bzw. seine Ausscheidung beim Menschen. Auch orale Glucosebelastungen, die zu hohen Insulinspiegeln führten, hatten keinen Einfluß auf die Urinausscheidung von cAMP (27).

Gabe von ACTH^{**} hat keinen Effekt auf die cAMP-Ausscheidung, obwohl es nach ACTH zu extremen Anstiegen der intrazellulären Konzentrationen an cAMP in der Nebennierenrinde kommt (23).

Corticosteroide und Thyroxin, die an der hypophysektomierten bzw. thyreoparathreoidektomierten Ratte den Abfall der cAMP-Ausscheidung hemmen (31), haben keine oder nur minimale Effekte beim Menschen (23).

Fußnote * ADH = Antidiuretisches Hormon

Fußnote ** ACTH = Adrenocorticotropes Hormon

Angaben über die Extrazellulärspiegel der cyclischen Nucleotide nach Prostaglandingaben sind uns nicht bekannt. Prostaglandin E 1 hemmt die parathormon-sensitive Adenylatcyclase und den Anstieg des intrazellulären cAMP-Spiegels nach Gaben von Parathormon (32). Die antilipolytische Wirkung von Prostaglandin E 1 an isolierten Fettzellen ist auf eine Verminderung der cAMP-Konzentration zurückzuführen. In anderen Geweben steigert Prostaglandin E 1 dagegen die Konzentration des cyclischen Nucleotids (33).

Generell kann gesagt werden, daß durch unterschiedliche Hormone die intrazellulär an den jeweiligen Erfolgsorganen bedingte Konzentrationsänderungen der cyclischen Nucleotide sich nicht in jedem Fall in Änderung der Extrazellulärkonzentration zu äußern brauchen. Der Grund hierfür liegt vielleicht in der extrem schnellen Metabolisierung der cyclischen Nucleotide nach ihrem Austritt in den Extrazellulärraum, so daß die steilen Konzentrationsgefälle im abführenden Gefäßsystem nur durch gezielte Kathederuntersuchungen zu erfassen sind (37).

2. Kinetik der extrazellulären Nucleotidspiegel

Von mehreren Autoren wurde ein Tagesrythmus in der Urinausscheidung von cAMP und cGMP festgestellt mit einem Maximum zwischen 9 - 12 Uhr, einem Minimum von 18 - 21 Uhr und einem weiteren Anstieg zwischen 24 - 3 Uhr (34). Dieser Rythmus ist nicht parathormonabhängig, da er selbst bei Parathyreoidektomierten auftrat und keine Korrelation zur Phosphatausscheidung bestand (24).

Beide cyclische Nucleotide sind im Plasma nicht an Protein

gebunden und entstammen nur zum unwesentlichen Anteil den korpuskulären Bestandteilen des Blutes. Zwischen intrazellulärer Synthese der Nucleotide, Durchtritt durch die Zellmembran, Abbau und Ausscheidung, besteht ein Fließgleichgewicht. Die an das Plasma abgegebenen Mengen betragen 9 - 17 n mol cAMP/min., 7 - 13 n mol cGMP/min. (35). Die Halbwertszeit für cAMP beträgt ca. 30 Minuten.

Die Entfernung von cAMP, (cGMP) aus dem Plasma geschieht zu 19 % (13 %) auf renalem Wege durch glomeruläre Filtration, die Clearance des verbleibenden Restes (81 %, 87 %) aus dem Plasma geschieht auf noch wenig bekannte Art (35). Studien mit Infusion von Tritium markierten cyclischen Nucleotiden bei Hunden (36) ergaben, daß die Leber 25% und die Nieren 11% der total verabreichten Radioaktivität aus ^3H cAMP rasch akkumulierten, während Lunge und Skelettmuskel einen wesentlich geringeren Anteil der Radioaktivität aufnahmen. In allen untersuchten Geweben jedoch konnte Radioaktivität nachgewiesen werden, wenn auch in wesentlich geringerer Anreicherung (bezogen auf mg Gewebe). Die Radioaktivität betrug im Gewebe nach 90 Minuten das ungefähr 20 - 100 fache als im Plasma. Diese starke Akkumulation legt die Vermutung nahe, daß die Aufnahme der markierten Nucleotide in den Intrazellulärraum weitgehend irreversibel zu sein scheint. Es zeigte sich bei chromatographischer Auftrennung und Identifizierung der Radioaktivität im Nierengewebeextrakt, daß der Großteil der Aktivität anderen als den cyclischen Nucleotiden zugehörigen Fraktionen zuzuordnen war (36). So erscheint es möglich, daß die schnelle Metabolisierung der cyclischen Nucleotide innerhalb der Zelle zu verwandten Verbindungen, die wesentlich langsamer aus dem Intrazellulärraum austreten können, den Grund für die Fähigkeit zur Akkumulation in den genannten Geweben darstellt (98).

Welche Bedeutung diesem Vorgang der "metabolischen Plasma clearance" zukommt, ist noch unklar. Die Anteile der verschiedenen Organe an der Plasmaproduktionsrate der Nucleotide unter Basalbedingungen ist also unbekannt, obwohl sich die Niere und Leber unter Hormonstimulation als Produzenten identifizieren ließen. Jedenfalls scheinen diejenigen Organe, die wahrscheinlich für den Großteil der Plasmaproduktionsrate verantwortlich sind, auch die Hauptrolle bei der Elimination der cyclischen Nucleotide aus dem Plasma zu spielen.

3. Normwerte extrazellulärer Konzentrationen der cyclischen Nucleotide

Wie bereits erwähnt, wird der Gesamtteil des im Urin erscheinenden cGMP dem Plasma allein durch glomeruläre Filtration entnommen, während ein variierender Anteil des Urin cAMP aus der Niere selbst als Ausdruck der in den proximalen Tubuli lokalisierten parathormonsensitiven Adenylatcyclase stammt (17, 20, 35, 41).

Dieser Parathormon bedingte Anteil scheint individuell konstant zu sein, variiert aber von Individuum zu Individuum, so daß eine eindeutige Korrelation zwischen Plasma-cAMP-Spiegel und Urinausscheidung an cAMP im Kollektiv nicht gegeben erscheint. Es ist daher sinnvoll, die cAMP-Ausscheidung nicht nur auf die Zeiteinheit (24-Stundensammelurin) sondern auch auf die Creatininausscheidung zu beziehen. Ferner ist zu bedenken, daß ein Tagesrhythmus der cAMP-Ausscheidung besteht, der keine Korrelation zum Parathormonspiegel zu haben scheint (siehe Abschnitt: Kinetik der extrazellulären Nucleotide). Angaben über die in der Literatur beschriebenen und mit unterschiedlichen Methoden gemessenen Extrazellulärspiegel sind in Tabelle 1 zusammengestellt.

Tabelle 1

Extrazelluläre Konzentration cyclischer Nucleotide
beim Menschen

Extrazel- lulärflüs- sigkeit	Cycl. Nucleo- tid	Konzentrationen Ausscheidung		Literatur
Plasma	cAMP	10-25	nmol/l	(35)
		25,9 [±] 2,1	nmol/l	(10)
		15	nmol/l	(48)
		10,6-21,8	nmol/l	(28)
		21,8 [±] 8,8	nmol/l	(71)
		8-20	nmol/l	(47)
	cGMP	2-16	nmol/l	(35)
		2-4	nmol/l	(48)
		4-11	nmol/l	(28)
		1,8-6,0	nmol/l	(47)
Urin	cAMP	2-7	umol/die	(18)
		1,8-9	umol/die	(35,17)
		1,5-5	umol/g Creati- nin	(35,17)
		4,4 [±] 0,3	umol/g Creat.	(21)
		5,4 [±] 0,7	umol/die	(76)
		3,5 [±] 0,2	umol/die	(22)
		1,4-3,2	umol/die	(77)
		2,6-10,5	umol/die	(23)'
		1,1-8,6	umol/die	(20)'
		2,7 [±] 0,5	umol/g Creat.	(26)
		2,5 [±] 0,13	umol/g Creat.	(24)
		6,2 [±] 0,5	umol/die	(78)
		4,03 [±] 0,3	umol/die	(82)'+
		2,9 [±] 1,1	umol/g Creat.	(71)
		5,2 [±] 0,9	umol/g Creat.	(71)''
		2,9-11,2	umol/die	(28)'
		2,4-5,4	umol/g Creat.	(79)
		1,6-3,8	umol/g Creat.	(80)
		2,37 [±] 0,41	umol/g Creat.	(81)'''

Tabelle 1
Fortsetzung

Extrazel- lulärflüs- sigkeit	Cycl. Nucleo- tid	Konzentrationen Ausscheidung	Literatur
	cGMP	0,4-3,0 umol/die	(17,35)
		0,3-1,8 umol/g Creat.	(17,35)
		0,19-2,28 umol/die	(23)
		0,55 ⁺ -0,08 umol/g Creat.	(24)

' = berechnete Daten

'' = Kinder (2,5 - 10 Jahre)

''' = Neugeborene einen Tag nach Geburt

+ = Werte, bezogen auf 1,73 m² Körperoberfläche

4. Vergleich verschiedener Meßmethoden für cyclische Nucleotide

Da die Extrazellulärspiegel der cyclischen Nucleotide konstant und geringen Schwankungen unterworfen sind, liegt es im Interesse der klinisch-chemischen Forschung, einen Zusammenhang zwischen Krankheitsbildern, die durch hormonelle Fehlregulationen bedingt sind und den eventuell dadurch bedingten Veränderungen der Extrazellulärspiegel der cyclischen Nucleotide aufzudecken. Dies wäre eine wertvolle Bereicherung der klinisch-chemischen Diagnostik. Dazu ist die Erstellung von allgemein anerkannten Normwerten ein unumgänglicher Schritt.

Da die cyclischen Nucleotide im Gewebe und besonders im Extrazellulärraum in den extrem niedrigen Konzentrationen von $\mu\text{mol/l}$ bis nmol/l auftreten und damit um einige Größenordnungen unter denen andere Nucleotide liegen, war die Entwicklung empfindlicher Testmethoden eine Vorbedingung.

Die heute in der Literatur beschriebenen Testmethoden beruhen im wesentlichen auf folgenden Charakteristika:

- 1) Überführung von cAMP in andere Metabolite und deren enzymatische Bestimmung
- 2) Aktivierung Nucleotid-abhängiger Proteinkinasen durch das jeweilige Nucleotid
- 3) Bindung an Antikörper oder spezifische Bindungsproteine
- 4) Chromatographische Methoden

Bei der Wahl einer dieser Bestimmungsmethoden ist zu berücksichtigen, daß die Methode für die Fragestellung ausreichend sensitiv sein muß, daß sie einen möglichst großen Meßbereich überstreichen soll, daß der Arbeitsaufwand der Herstellung von Hilfsreagentien, als auch der eigentlichen Messung nicht zu aufwendig ist, wozu als wichtiges Kriterium gehört, daß die Methode spezifisch das zu messende Nucleotid bestimmt und keine Korrekturen des Ergebnisses erforderlich sind (38).

Die 1958 von Rall und Sutherland (38) entwickelte Methode der Messung von cAMP durch Überführung der inaktiven Form der Phosphorylase in die aktive, war mehrere Jahre Methode der Wahl. 1964 zeigte Breckenridge ein neues System auf. Die Sequenz führte dabei vom cAMP über eine gereinigte Phosphodiesterase zum 5'-AMP, von hier über die Reaktion der Adenylatkinase und der Pyruvatkinase zum ATP (39).

ATP läßt sich dann auf mehrere Arten bestimmen: über die Reaktion der Hexokinase und der Pyruvatkinase (40), über die Markierung des ATP aus ^{32}P als Reaktion der Phosphoglyceratkinase und der Glyceraldehydphosphat-Dehydrogenase (41), oder als Substrat des Luciferin-Luciferase-Systems (42-44). Diesen zuletzt genannten Methoden haftet, obwohl sie durch Verfeinerung cAMP noch in pmol-Mengen bestimmen können, der Nachteil an, daß das Nucleotid chromatographisch exakt von anderen Nucleotiden abgetrennt werden muß und sie damit methodisch und zeitlich aufwendig sind.

Brooker (45) erweiterte 1968 das Spektrum der Meßmethoden um eine neue Variante, indem er vorschlug, im Sinne eines Isotopenverdünnungstestes als Substrat für die ge-

reiniigte Phosphodiesterase markiertes und unmarkiertes cAMP anzubieten. Um in den niedrigen Konzentrationsbereich von cAMP im Gewebe zu kommen, war eine Phosphodiesterase mit sehr niedriger K_m für cAMP Voraussetzung. Ein solches Enzym wurde neben einer für cGMP spezifischen Form im Rattenhirn gefunden (45). Dennoch ist diese Methode den meisten anderen an Sensitivität unterlegen. Die von Brooker (42, 46) 1970 veröffentlichte "high pressure anion exchange chromatography" zur Messung von cAMP und cGMP soll wegen ihres apparativen Aufwandes und den damit verbundenen Kosten nur am Rande erwähnt werden.

Der von Steiner et.al. (47 - 50) beschriebene hochsensitive Radioimmunoassay für Ado-3'-5'-P, Guo-3'-5'-P, Ino-3'-5'-P* und Urd-3'-5'-P** beruht auf der Gewinnung von Antikörpern vom Kaninchen gegen die in 2'-O-Position succinylierten und an Protein gebundenen cyclischen Nucleotide. Markiertes Antigen höher spezifischer Aktivität wird durch Anhängung eines Tyrosinrestes an die succinylierten Derivate und nachfolgende 131 Jod- oder 125 Jod-Markierung gewonnen. Das Testprinzip ähnelt dem von Yalow und Berson für Insulin beschriebenen (51). Die Methode zeigt eine sehr hohe Sensitivität - bei entsprechender Reduzierung des Inkubationsvolumens können bis zu 50 fmol cAMP nachgewiesen werden - bei relativ weitgestrecktem Meßbereich. Ihre Spezifität (fehlende Kreuzreaktion mit anderen Nucleotiden) ist sehr gut. Bei Doppelmarkierung ($^{125}\text{J}/^{131}\text{J}$) lassen sich cAMP und cGMP simultan bestimmen. Nachteilig sind die Aufwendigkeit der Antigen- und Antikörperherstellung und für Serienmessungen die relativ lange Inkubationszeit von 6 h.

Fußnote * = cyclisches Inosin-3'-5'-monophosphat

Fußnote ** = cyclisches Uridin-3'-5'-monophosphat

Die Auffindung cAMP-abhängiger Proteinkinasen, zuerst in Skelettmuskel und Leber, danach in einer Vielzahl unterschiedlicher Gewebe und cGMP-abhängiger Proteinkinasen bei Arthropoden ermöglichte neue Meßmethoden. Getreu dem in Abbildung 1 aufgezeigten Schema kann die Konzentration des cyclischen Nucleotides prinzipiell auf zweierlei Art bestimmt werden:

- 1) durch seine Eigenschaft, die Phosphorylierungsrate einer Proteinkinase konzentrationsabhängig zu stimulieren
- 2) durch Bindung an die Regulatoreinheit einer Proteinkinase und Konkurrenz mit markiertem cAMP um die Bindungsstelle im Sinne eines kompetitiven Isotopenverdünnungstestes.

Eine Reihe prinzipiell gleicher Methoden, die auf der Aktivierung der Phosphorylierungsreaktion durch das jeweilige Nucleotid beruhen, ist in der Zwischenzeit publiziert worden (52 - 56). Sie unterscheiden sich meist nur hinsichtlich der Präparation der verwendeten Proteinkinasen und der jeweiligen Proteinsubstrate.

Prinzip der Methode ist die Übertragung der markierten γ -Phosphatgruppe des ATP auf ein Akzeptorprotein, z.B. Histon, Protamin, Phosvitin oder Casein, durch eine von der Konzentration an cAMP- oder cGMP-abhängige Proteinkinase. Das System ist hochspezifisch, hat aber methodische Nachteile: γ - ^{32}P -markiertes ATP ist teuer und nicht lange haltbar. Neben der nötigen Proteinkinase muß auch das Substrat (z.B. Histon) selbst präpariert werden, da die kommerziellen Produkte häufig nicht genügend hohe Einbauraten zeigen (57).

Limitiert ist die Methode durch die Tatsache, daß die gereinigten Proteinkinasepräparationen eine von exogenem cAMP unabhängige Basisphosphorylierungsrate zeigen, die entweder durch eine cAMP-unabhängige Kinase oder durch endogen gebundenes cAMP bedingt ist (58).

Walton und Garren (59), Gilman und Brown et.al. (61) veröffentlichten unabhängig voneinander 1970 Testmethoden für cAMP, die auf der Bindung von markiertem cyclischen Nucleotid an die Regulatoreinheit einer Proteinkinase und deren Veränderung durch unmarkiertes Substrat als Standard oder Unbekannt-Probe im Sinne eines Isotopen-verdünnungstestes beruht.

Wir übernahmen als Meßmethode das zuletzt genannte System in modifizierter Form, da es für den beabsichtigten Zweck der zukünftigen Anwendung in der klinisch chemischen Diagnostik entscheidende Vorteile gegenüber den vorher beschriebenen Meßmethoden aufweist:

- Die Anzahl der einzelnen Pipettierschritte ist gering.
- Die Inkubationszeit ist mit 75 Minuten nicht sehr lang.
- ^3H cAMP ist billiger als andere markierte Substrate, hochmarkiert erhältlich und bei richtiger Handhabung auch haltbar.
- Durch Variation der Trennungsbedingungen von gebundenem und freiem markiertem Nucleotid eröffnet sich die Möglichkeit der Automation sämtlicher Pipettiervorgänge.
- Für eingearbeitete Untersucher ist die manuelle Messung von ungefähr 60 Doppelwerten in etwa 3 Stunden möglich.
- Die Präparation des Bindungsproteins ist einfach und von hoher Ausbeute. Eine besondere Reinigung scheint nicht unbedingt notwendig. Wir gewannen in 2 Tagen Material

für etwa 60.000 Tests. Das Bindungsprotein zeigt bei -34° auch nach einem Jahr Lagerung keine Abnahme der Bindungskapazität.

- Bei der Präparation unseres Proteins richteten wir uns nach der Beschreibung von Miyamoto et.al. (62), die nach Rubin et.al. (63) durch den DEAE-Cellulose Schritt modifiziert wurde. Eine Zusammenfassung des sechs Schritte umfassenden Verfahrens ist in Tabelle 2 aufgeführt.

III. Eigene Untersuchungen

A) Methodischer Teil

1. Präparation von cAMP-Bindungsprotein aus Rinderherzmuskel

Rinderherz wird unmittelbar nach Schlachtung gewonnen und auf Eis transportiert. Mit dem Skalpell wird es von Endo- und Perikard sowie Fett getrennt und in kleine Stückchen geschnitten. 1.200 g werden bei minus 32°C eingefroren für 18 h. Nach dem Auftauen wird der Muskel portionsweise mit insgesamt 4 l 0.004 M EDTA, pH 7.0 für 1 Minute in einem Bosch-Starmix homogenisiert; nachfolgende Zentrifugation bei $12.000 \times g$ in Sorvall-Superspeed-Zentrifuge. Die Überstände werden vereinigt und erhalten die Benennung Ü 1. Die Sedimente werden nochmals in insgesamt 1 l 0.004 M EDTA, pH 7.0 extrahiert, zentrifugiert und die Überstände mit Ü1 vereinigt, die Pellets aufbewahrt; Gesamtvolumen von Ü1 3.600 ml (siehe Tabelle 2). Ü1 hat ein pH von 5.5 Er wird durch Zugabe von 400 ml einer 1 M Kaliumphosphatlösung, pH 7.2 auf 7.0 eingestellt.

Tabelle 2
Präparationsschema der Proteinkinase aus Rinderherz

Benennung	Schritt	Ges. Vol. ml	Ges. Protein mg	Ges. Bindungs- akt. pMol	Spez. Bindungs- akt. pMol/mg prot.	Anreich.- Faktor	Aus- beute
Ü 1	Homogenat-Ü	3600	54 000	144 000	2,66	1	100 %
Ü 3	AS-Fällung	360	6 840	270 000	39,4	15	87 %
Ü 5	DEAE-sephadex Chromatographie batch	1000	1 500	120 000	80,0	30	83 %
Ü 8	DEAE-cellulose Säulen-chromat.	400	80	20 000	250	94	14 %
Ü 9	AS-Fällung	13	20.8	19 500	1060	398	13 %

Ammoniumsulfatfraktionierung

Durch Zugabe von 320 g Ammoniumsulfat/l, wird die AS-Konzentration auf 160 g/l gebracht. Die Lösung wird für zwei Stunden bei 4°C vorsichtig gerührt und danach für 15 Min. bei 12 000 x g zentrifugiert. Das entstandene Sediment wird in 300 ml einer Pufferlösung von 50 mM Tris-HCl, pH 7.6, die 10 mM NaCl enthält, aufgenommen; Gesamtvolumen = 360 ml. Die Überstände werden verworfen.

Die leicht trübe Lösung wird für 16 h gegen zweimal 10 l 5 mM TRIS-HCl, pH 7.6 + 10 mM NaCl dialysiert und danach bei 28 000 x g abzentrifugiert; die entstandenen klaren Überstände = Ü 3, Gesamtvolumen = 360 ml.

DEAE-Sephadex A50, batch-Verfahren

25 g DEAE-Sephadex A50 werden durch mehrmaliges Waschen mit 50 mM TRIS-HCl, pH 7.6 + 10 mM NaCl äquilibriert und zuletzt in 500 ml des oben genannten Puffers suspendiert. Zu dieser Suspension wird Ü 3 zugegeben und für 45 Min. bei 4°C vorsichtig gerührt. Danach wird die Suspension auf einer Nutsche mit Whatman No. 1 Filterpapier abgetrennt und zweimal mit 750 ml des gleichen Puffers nachgewaschen, bis die Waschflüssigkeit farblos ist. Das Waschwasser, das keine Aktivität enthält wird verworfen. Das Filtrat wird danach 65 Min. in 600 ml 50 mM TRIS-HCl, pH 7.6 + 300 mM NaCl bei 4°C gerührt, danach wiederum auf Nutsche filtriert und mit insgesamt 500 ml des gleichen Puffers nachgewaschen. Die filtrierte Fraktion - insgesamt 1000 ml - enthält die Benennung Ü 5.

Ü 5 wird nochmals mit 50 mM TRIS-HCl, pH 7.6 + 500 mM NaCl nachextrahiert, da sich offensichtlich noch nicht alle Aktivität vom Ionenaustauscher abgelöst hat. Nochmalige Fil-

tration über Whatman No. 1 und Nachwaschen mit 500 ml des gleichen Puffers. Der Nachwasch wird mit Ü 5 vereinigt und erhält die Benennung Ü 6; Gesamtvolumen von Ü 6 = 1600 ml.

Ammoniumsulfatfällung

Durch Zugabe von 450 g Ammoniumsulfat/l wird die AS-Konzentration von Ü 6 auf 75 % gebracht, die Lösung bei 4°C 30 Min. gerührt und nach der nachfolgenden Zentrifugation bei 12 000 x g die Sedimente in einem geringen Volumen an 5 mM Kaliumphosphatpuffer, pH 6.2 gelöst. Die Fraktion erhält die Benennung Ü 7; Gesamtvolumen = 70 ml.

Chromatographie an DEAE-Cellulose

DEAE-Cellulose wird ausgiebig mit 5 mM Kaliumphosphatpuffer, pH 7.0 äquilibriert und danach in eine Säule (Länge 30 cm, Durchmesser 1,5 cm) gefüllt. Die Säule wird anschließend mit dem ca. zehnfachen Volumen des gleichen Puffers nachgewaschen. Fraktion Ü 7 wird aufgetragen und mit zweifachem Säulenvolumen an 5 mM Kaliumphosphatpuffer, pH 7.0 nachgewaschen, danach die Bindungsaktivität mit einem linearen Gradienten von 10-400 mM Kaliumphosphat, pH 7.0 von der Säule gewaschen und fraktioniert aufgefangen. Protein kommt in einem breiten "peak" von der Säule (siehe Abb. 3). Die Fraktionen 45 - 120 werden gepoolt und erhalten die Benennung Ü 8; Gesamtvolumen = 400 ml.

Ammoniumsulfatfällung

Ü 8 wird durch Zugabe von insgesamt 170 g festem AS auf 75 % AS-Sättigung gebracht, 30 Min. bei 4°C gerührt und

anschließend 30 Min bei 28 000 x g zentrifugiert. Das kleine Pellet wird in 6 ml 4 mM Kaliumphosphatpuffer, pH 7.0 aufgenommen und 18 h gegen 10 l des gleichen Puffers dialysiert. Dies klare Dialysat erhält die Benennung Ü 9. Das Gesamtvolumen von 13 ml wird in Einzelportionen zu 10 µl bei minus 18°C eingefroren.

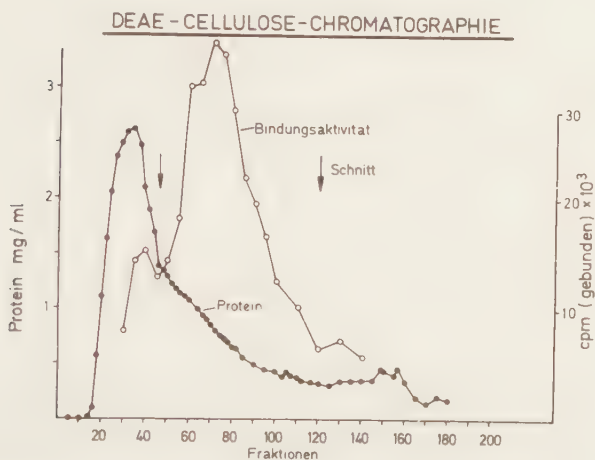


Abb. 3

Chromatographie von Fraktion Ü 7. Volumen der Einzelfraktionen 5 ml. Proteinbestimmung durch Absorption bei 280 nm. Ermittlung der Bindungsaktivität durch Inkubation mit 10 pMol ^3H cAMP/Ansatz (Sättigungsbereich). Einzelheiten siehe Testvorgang.

Eigenschaften des Bindungsproteins

Das Bindungsprotein (Fraktion Ü 9) ist ca. 400-fach angereichert und zeigt keine Phosphorylierungsaktivität mehr. Offensichtlich handelt es sich um die isolierte Bindungsuntereinheit einer Proteinkinase. Die spezifische maxima-

le Bindungsaktivität war mit ca. 1 nMol/mg Protein außerordentlich hoch.

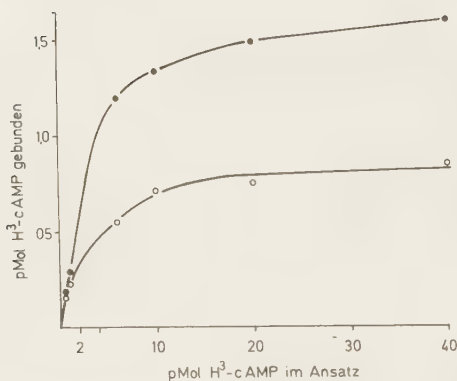


Abb. 4 a

Verhalten der Bindung von ^3H cAMP an das Bindungsprotein Ü 9 bei steigenden Mengen von ^3H cAMP im Inkubationsmedium.
 ○ — ○ 0.8 µg Ü 9 ● — ● 1.6 µg Ü 9

Versuchsbedingungen: 50 mM Na-acetat Puffer pH 4.0, Inkubationsvolumen 200 µl, Inkubationszeit 75 Min. Hieraus errechnet sich die maximale Bindungsaktivität von Ü 9 mit 1,06 nMol/mg Protein. Näheres siehe Kapitel III, Teil A), Punkt 2.

Die aus der doppelt reziproken Auftragung nach Lineweaver-Burk graphisch ermittelte Assoziationskonstante (K_{ass}) betrug 1.5×10^{-8} Mol/l (siehe Abb. 4 b). Das Protein zeigte bei tiefgefrorener Aufbewahrung (-34°C) auch nach einem Jahr keine Abnahme der Bindungskapazität. Innerhalb von zwei Tagen wurde Material für etwa 60 000 Tests gewonnen.

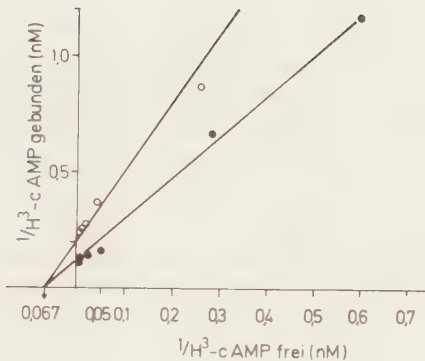


Abb. 4b

Doppelt reziproke Auftragung von 4a nach Lineweaver-Burk. Der Schnittpunkt beider Geraden mit der Abszisse liegt bei -0.067 nM^{-1} . Daraus ergibt sich eine Dissoziationskonstante von $1,5 \times 10^{-8} \text{ M}$ für das Bindungsprotein Ü 9.

Eine so weitgehende Reinigung des Bindungsproteins erscheint nicht unbedingt notwendig, erhöht die Sensitivität des Testes aber merklich. Nachteile entstehen jedoch durch die mit dem Reinheitsgrad der Proteinkinase ansteigende Beeinflussbarkeit des Testsystems durch interferierende Faktoren im biologischen Material. So erscheint in vielen Fällen die Verwendung einer Charge geringeren Reinheitsgrades sogar zweckmäßiger zu sein.

2. Bestimmung von cAMP mit der modifizierten Methode nach Gilman

Material

- Proteinkinase aus Rinderherz (siehe Präparation)
- ^3H cAMP (24,1 mCi/m mol., 1 pMol = 22 000 cpm)
- unmarkiertes cAMP (als Standard oder zu messendes Substrat)
- Natriumacetat Puffer 200 mM pH 4.0
- Kaliumphosphatpuffer 20 mM pH 6.2
- Millepore R Filter (HAWPO 2400) 0.45 μ
- Bray'sche Lösung

Pipettierschema siehe Anhang

Testvorgang

Alle Schritte des Testvorganges müssen bei einer Temperatur von 0°C ablaufen, wobei die Erhaltung der Kühlkette besonders nach Starten der Reaktion und beim Filtern aufrechterhalten werden muß. Als Reaktionsgefäß dienen Eppendorf cups aus Plastik mit einem Fassungsvermögen von ca. 1,4 ml. Zur Kühlhaltung des Reaktionsgemisches werden diese Gefäße in Alublöcke mit passenden Bohrungen versenkt, wobei diese Metallblöcke in einem Eisbad stehen.

Beim Pipettiervorgang wird folgende Reihenfolge eingehalten:

Als erstes werden 50 μl des Acetatpuffers (200 mM, pH 4.0) einpipettiert. Es folgen 20 μl der markierten cAMP Probe und anschließend unmarkierter Standard an cAMP und H_2O

bzw. die zu messende Probe zu einem Gesamtvolumen von 180 μ l je Testansatz.

Vor Zugabe des Bindungsproteins als Starter der Reaktion muß dieses Gemisch auf einem elektrischen Rüttler im Kühlraum durchgeschüttelt werden, ohne dabei erwärmt zu werden. Schütteln nach Zugabe des Bindungsproteins hat sich bei uns in leichtem Aktivitätsverlust und in schlechteren Doppelwerten bemerkbar gemacht.

Nach dem Schütteln ist vor dem Starten der Reaktion darauf zu achten, daß sich keine Tropfen des Reaktionsgemisches an den Wänden des Gefäßes befinden, sodaß das Protein in das gesamte Volumen hineinpipettiert wird. Dazu ist es zweckmäßig, jedes Gefäß einzeln in die Hand zu nehmen und unter Sicht 20 μ l des Bindungsproteins zuzufügen (Endvolumen 200 μ l). Um die oft kohärente Proteinlösung quantitativ einbringen und verteilen zu können, empfiehlt sich das mehrmalige Aufsaugen und Ausdrücken des Gemisches durch die automatische Pipette. Danach wird das Gefäß geschlossen und wie beschrieben inkubiert.

Markiertes und unmarkiertes cAMP muß in tiefgefrorenem Zustand aufbewahrt werden. Mehrmaliges Wiedereinfrieren und -auftauen ergab wie bei dem Bindungsprotein einen Verlust an Genauigkeit.

Es empfiehlt sich daher, die für jeweils einen Versuch benötigten Mengen gesondert einzufrieren. Die unmarkierten Standards sind vor jedem Versuch in einer Verdünnungsreihe neu herzustellen.

Die Inkubation sollte in gekühltem Raum erfolgen, um eine Erwärmung der Proben von oben her zu vermeiden. Nach

Gilman (60) ist die Gleichgewichtsreaktion bei 0°C nach 60 Minuten erreicht und zeigt nur langsame Rückreaktion, sodaß der Bindungsverlust pro Stunde ca. 5 % beträgt. Unsere eigene Messung liefert dasselbe Ergebnis:

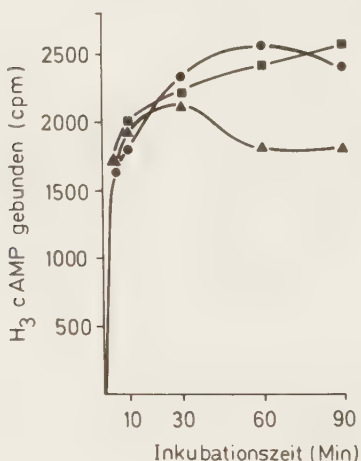


Abb. 5

Zeitabhängigkeit der Bindung von ^3H cAMP an das Bindungsprotein und der Einfluß von Mg^{+2} auf die Gleichgewichtseinstellung.

●—● ohne Mg^{+2} ▲—▲ 5 mM Mg^{+2} im Medium

■—■ 5 mM Mg^{+2} und 10 mM EDTA im Medium

Bedingungen: 50 mM TRAP Puffer pH 7.0, 2,5 pMol ^3H cAMP, 1,6 μg Ü 9, Inkubationsvolumen 200 μl .

Wie bei Gilman beschrieben beschleunigt Mg^{+2} die Hin- und Rückreaktion während EDTA diesen Prozeß stabilisiert.

Tao et.al. (64) zeigten, daß Mg^{+2} die Bindung des Proteins an Filter beeinflusst. Wir fanden bei Zugabe von Mg^{+2} (2 mM) zum Wasch Puffer ebenfalls eine verminderte Bindung:

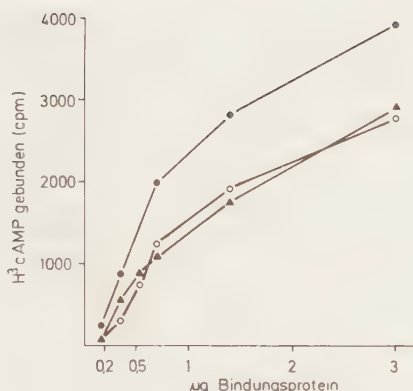


Abb. 6

Einfluß von Mg^{+2} auf die Adsorption des Bindungsproteins an Millipore Filter HAWPO 2400 (0,45 u). Steigende Mengen an Protein wurden für 30 Minuten mit 0,5 pMol 3H cAMP inkubiert. Puffer: 50 mM Na-acetat, pH 4.0

● —● ohne Mg^{+2} ○ —○ 2 mM Mg^{+2} im Waschpuffer
 ▲ —▲ 2 mM Mg^{+2} im Inkubationsmedium

Die Inkubationszeit bei den cAMP-Messungen betrug 75 Minuten. Um für jede Probe diesen Zeitraum exakt einzuhalten, muß sich der Zeitpunkt des Startens der Reaktion nach dem langsameren Vorgang des Filterns richten, d.h. die Proben müssen in entsprechender zeitlicher Abfolge gestartet werden.

Zur Trennung des gebundenen vom freien markierten cAMP durch Adsorption an Millipore-Filter verwenden wir eine Apparatur mit 6 bzw. 12 Filterträgern, die an eine Wasserstrahlpumpe angeschlossen ist und an der jeder Filter wahlweise unter Sog gebracht werden kann. Verwendet werden Celluloseester Millipore Filter HAWPO 2400 (0,45 u), die vorher mit eisgekühltem 20 mM Kaliumphosphatpuffer

pH 6.2 gekühlt und unmittelbar vor dem Auftragen des Reaktionsgemisches mit demselben nochmals getränkt werden.

Die Inkubation wird durch Zugabe von 500 μ l des obigen eiskalten Puffers beendet. Dann erfolgt die quantitative Auftragung der 700 μ l auf den unter Sog stehenden, gekühlten Filter, der sogleich die Spülung mit 5 ml Puffer folgt. Von 3 ml aufwärts war das Volumen des durchgespülten Puffers ohne Einfluß auf die ^3H cAMP-Bindung. Nach der Spülung wird der Sog geschlossen und der Filter in 10 ml Bray'scher Lösung in einem Scintillationsgefäß eingebracht und die Radioaktivität in einem "Nuklear Chicago Mark II Scintillation Spectrometer" gezählt. Diese Scintillationslösung erbrachte die beste Zählausbeute und der Filter war gut in ihr löslich. Der Filter selbst hielt in Abwesenheit des Bindungsproteins kein freies cAMP zurück.

3. Graphische Darstellung und Auswertung der Eichkurven

In der Literatur werden für die Auswertung radiologischer Bindungsteste Methoden angegeben, die die Linearisierung der Eichkurven zum Ziel haben. Gilman (60) erreicht die Linearisierung der Eichkurven durch doppelt log. Auftragung, wobei die Gesamt pMol im Ansatz (Abszisse) gegen die gebundenen pMol (Ordinate) jeweils im log. Maßstab aufgetragen werden. Dies führt jedoch nur im Falle der Sättigung des Proteins mit ^3H cAMP zur Linearisierung. Bei unseren Versuchen gelang die Linearisierung nur annähernd unter Interpolation.

Eine andere Art der Auftragung ist die Methode der "logit transformation" nach Rodbard et.al. (66).

Die besten Ergebnisse erhielt ich mit der einfach rezipro-

ken Auftragung (67, 68). Hierbei wird der reziproke Wert der gebundenen Zählraten (oder cAMP-Mengen) gegen die Menge des im Ansatz befindlichen cAMP aufgetragen. Mit dieser Auftragsart wurde eine gut linearisierbare Darstellung der Eichkurven erzielt.

Nach Gilman (60, 65) liegt das Optimum der Bindung von cAMP an Proteinkinasen bei pH 4.0. Versuche bei pH 7.0 bis 7.6 mit TRIS oder TRAP Puffer zeigten eine um 50% niedrigere Bindung, schlechtere Linearisierbarkeit im "single reciprocal plot", eine geringere Sensitivität und breite Streuungen bei Mehrfachbestimmungen. Obwohl für manche Zwecke die Messung im neutralen Bereich günstiger wäre, führe ich deshalb den Test in 50 mM Natriumacetat pH 4.0 durch. In der Sättigungskinetik der von mir verwendeten Bindungsproteine zeigte sich, daß die optimale Sensitivität des Testes weder im Bereich der Sättigung, noch des Proteinüberschusses liegt. Ich führe die Messungen meist mit nicht sättigenden bis submaximal sättigenden Konzentrationen von ^3H cAMP durch (z.B. 1 pMol ^3H cAMP/ 0,8 μg Bindungsprotein, oder 5 pMol ^3H cAMP/ 0,31 μg μg). (Vergleiche Sättigungskurve Abb. 4 a!). Hierbei wurde eine optimale Linearisierung bis zu einem Bereich von 40 pMol erreicht.

Daß bei 10 - 20 pMol Zugabe des kalten Standards schließlich doch eine Sättigung des Proteins mit cAMP stattfindet, kommt nicht in einer Kontinuitätsänderung im "single reciprocal plot" zum Ausdruck.

Um die Fehlerbreite zu verringern, ist eine genügende Zählausbeute von 6000 - 10 000 cpm Bindung notwendig. Dies wurde durch Variation der ^3H cAMP Vorlage und/oder der Menge des eingesetzten Bindungsproteins erreicht, wo-

bei aber darauf geachtet wurde, daß im submaximal gesättigten Bereich gemessen wird.

Einige Beispiele für Eichkurven und deren Linearisierung zeigen Abbildungen 7 a und 7 b.

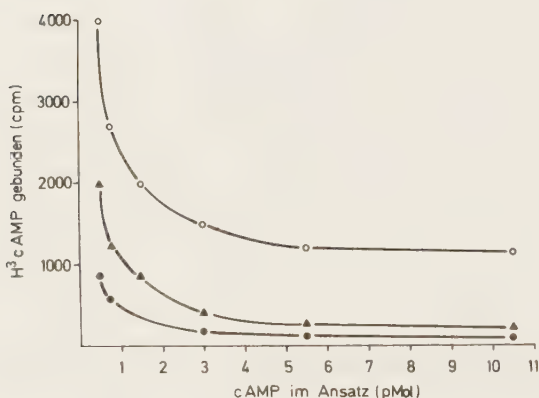


Abb. 7 a

Einfluß der Proteinkonzentration auf Sensitivität und Verlauf der Eichkurve; Bedingungen: 50 mM Na-acetat Puffer pH 4.0
0,5 pMol ^3H cAMP

● — 0,16 µg Ü 9 ▲ — 0,4 µg Ü 9 ○ — 0,8 µg Ü 9

Die gute Linearisierbarkeit unter den oben genannten Bedingungen erlaubte die Erstellung von Eichkurven durch die Bestimmung von nur drei Doppelwerten (z.B. cAMP Zugabe 0,5, 10 p Mol).

Wir konnten die linearisierte Eichkurve in einem Computerprogramm zur Auswertung der Messung anwenden. Akzeptiert wurden die Eichkurven bei einem Korrelationskoeffizienten von $> 0,99$. Die Berechnung erfolgte mit einem selbst erstelltem Computerprogramm (basic-program) in einem Hewlett-Packard Prozeßrechner (Typ 2114 B).

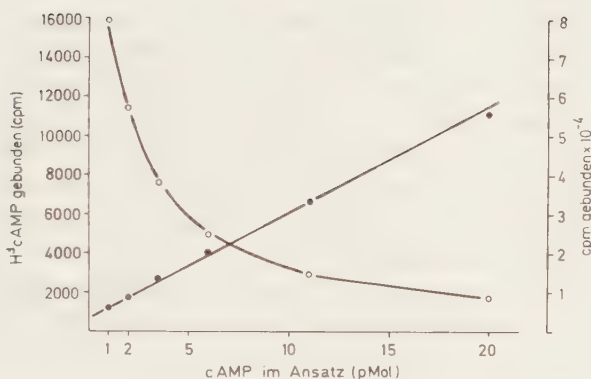


Abb. 7 b

Beispiel einer Eichkurve und deren Linearisierung im "single reciprocal plot"; Versuchsbedingungen: siehe Kapitel "Testvorgang"

Bindungsprotein Ü 7b 19,2 μg $^3\text{H cAMP}$ 1 pMol

- ——— ○ gebundene Aktivität (cpm)
 ● ——— ● $1/\text{gebundene Aktivität (cpm} \times 10^{-4})$

4. Vergleich der Kohle-Dextran-Methode oder der Sepharose-kopplung mit der Filtermethode

Die Methode der Trennung des gebundenen vom freien $^3\text{H cAMP}$ durch Filtrierung hat trotz der erzielten Präzision einige empfindliche Schritte in der Testprozedur, die bei Nichtbeachtung zur Fehlerquelle werden können:

Als erstes besteht die Schwierigkeit der zuverlässigen Kühlung der Proben, besonders auch während des Filter- und Spülvorganges, was bei einer großen Probenanzahl nicht immer gelingt und so zu Fehlern Anlaß geben könnte (60, 65).

Außerdem beschreiben Gilman (60, 65), wie auch Weller, Rodnight et.al. (68) nach Verdünnung des Ansatzes vor dem Filtervorgang eine rapide Abnahme der Bindung von ^3H cAMP um 10 - 20 % innerhalb von 30 Sekunden, danach eine relative Stabilität des Komplexes für einige Stunden bei 0°C (5% Verlust pro Stunde). Dies würde bedeuten, daß bei jeder Probe exakt die gleiche Zeit zwischen Endverdünnung und Auftragen auf den Filter eingehalten werden müßte. Dies ist, besonders bei großer Probenzahl und dem relativ zeitraubenden Filtervorgang, oft Quelle von Fehlern.

Um den Filtervorgang zu umgehen, wurden deshalb andere Methoden der Trennung des gebundenen ^3H cAMP vom freien vorgeschlagen:

- 1) Kopplung des Bindungsproteins an Sepharose (69) - so präpariertes Bindungsprotein sedimentiert und ermöglicht die Messung von gebundenem als auch freiem Nucleotid im Sediment bzw. Überstand und die Berechnung der wiedergefundenen Gesamtradioaktivität als Testkontrolle (61).
- 2) Adsorption des freien cAMP an Aktivkohle (61) und Gewinnung eines aliquots von Bindungsprotein aus dem nach Zentrifugation gewonnenen Überstand.
- 3) Fällung des Bindungsproteins mit gleichem Volumen gesättigter Ammonsulfatlösung und Messung des freien ^3H cAMP im Überstand (70).

Die unter 1) und 2) genannten Methoden wurden im Vergleich zur Filtermethode ausgetestet.

Die Kopplung des Bindungsproteins an BrCN-aktivierte Sepharose wurde nach der Vorschrift von Fisch, Pliska und Schwyzer (69) durchgeführt. Durch die kovalente Bindung des Bindungsproteins an den grossmolekularen Träger erhält man ein unlösliches cAMP bindendes Präparat, das durch zentrifugieren leicht abtrennbar ist. Der Vorteil dieser Trennungsart liegt in der Möglichkeit, die Menge des ungebundenen Nucleotids durch Entnahme eines aliquots vom Überstand direkt in der Scintillationszählung bestimmen zu können. Die Bestimmung des gebundenen Anteils der Radioaktivität geschieht durch die Filtermethode. Die Summe aus gebundener und freier Aktivität muß die Gesamtkativität der Vorlage ergeben, was zur Kontrolle der Messung dient.

Ich erhielt bei der Kopplung trotz verschiedener Mengenverhältnisse von Sepharose : Bindungsprotein stets einen Verlust an Bindungskapazität bis um den Faktor 150. Die dadurch benötigten hohen Mengen an Protein stellen einen methodischen Nachteil dar. Weitere methodische Nachteile ergaben sich aus der Beobachtung, daß das an Sepharose gekoppelte Protein durch Einfrieren teilweise zerstört wurde und auch bei 4° C kontinuierlicher Aktivitätsverlust eintrat.

Um nur eine geringe Zählausbeute bei dieser geringen Bindungskapazität zu erhalten, mußte ich die Vorlage von ^3H cAMP erhöhen. Dies führte aber nur zu einem Mißverhältnis von gebundener und freier Aktivität (1 : 10 bis 1 : 20), was die Messung im Überstand unmöglich machte.

Bei einer Erhöhung des Bindungsproteins trat mit Erhöhung der gebundenen Fraktion eine Verminderung der Wiederfindung von 90% auf 70% ein, die parallel zur freien Aktivi-

tät abfiel. Offensichtlich wurde Radioaktivität nach Bindung an die Sepharose-PK wieder aus der Bindung ausgewaschen. Dieses Phänomen ist in Abbildung 8 zu erkennen.

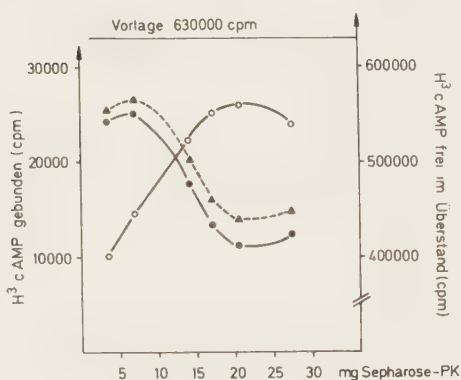


Abb. 8

Bindung von ^3H cAMP an steigende Mengen von Sepharose gekoppeltes Bindungsproteins (Sepharose-PK), Verhalten des freien cAMP im Überstand und Berechnung der Wiederfindung

○ — ○ an Sepharose-PK gebundenes ^3H cAMP

● — ● freies ^3H cAMP im Überstand

▲ — ▲ Wiederfindung als Summe von freiem und gebundenem cAMP.

Die im Test eingesetzte Gesamtradioaktivität von ^3H cAMP betrug 630 000 cpm. Wie man sieht, beträgt die maximale Wiederfindung bei 7 μg S-PK 90%, bei 21 μg S-PK 70%. Das Verhältnis von freiem zu gebundenem cAMP beträgt maximal 15 : 1.

Nachdem also die oben genannten Vorteile der Methode in dieser Proteinpräparation nicht zur Auswirkung kommen konnten und bereits gute Ergebnisse mit der Filtermethode vorlagen, wurde wegen der methodischen Schwierigkeiten diese Meßmethode verlassen.

Die unter 2) genannte Methode der Trennung von freiem und gebundenem Nucleotid durch Adsorption des freien cAMP an Aktivkohle wurde bereits 1970 von Brown et.al. (61) beschrieben.

Ich verwendete anstatt des von Brown (61) angegebenen NORIT GSX die Aktivkohle NORIT A, die eine relativ hohe unspezifische Bindung anderer Komponenten als cAMP besitzt (5 - 11% nach(61)).

Die optimale Kohlesuspension hatte unter unseren Bedingungen (pH 4.0, 200 μ l Testvolumen) folgende Zusammensetzung:

0,3 g NORIT A		
30 mg Dextran		
1,5 g Serumalbumin		
		in 100 ml Kaliumphosphat Puffer (20 mM, pH 6.2)

Der Testablauf wurde am Ende der Inkubation folgendermaßen abgewandelt:

Zum Inkubationsvolumen von 200 μ l wurden 100 μ l der Kohlesuspension zugegeben, die während des ganzen Arbeitsganges in einem Eisbad von einem Magnetrührer in Verteilung gehalten wird.

Die Gläser werden verschlossen und 5 Minuten in einer Kühlinsel bei 4° C gerüttelt, sodann 3 Minuten in einer Eppendorf-Zentrifuge bei 4° C zentrifugiert. Die Aktivkohle bildet dann ein je nach eingesetzter Kohlekonzentration mehr oder weniger kleines Sediment. Vom Überstand werden nun 100 μ l direkt in Bray'sche Scintillator zur Auszählung pipettiert.

Der Vorteil dieses Trennungsverfahrens liegt in der schnellen und quantitativ exakten Gewinnung eines Teils der gebundenen Fraktion des markierten Nucleotids. Bezüglich der beizufügenden "Kohlenmenge" ist folgendes zu beachten:

- 1) die Kohlenmenge muß hoch genug bemessen sein, um alle beim Test möglichen Konzentrationen an freiem cAMP (markiert und unmarkiert) in maximalem Verhältnis zu binden und soll dabei möglichst kein Bindungsprotein oder andere Bestandteile des zu messenden Substrats adsorbieren.
- 2) Die Kohlenmenge darf nicht zu hoch sein, da dann das entstehende Sediment bei Entnahme des Überstandes leicht aufgewirbelt wird und so ein Teil der freien Aktivität in den Überstand gerät. Außerdem besteht eine erhöhte Gefahr von unspezifischer Bindung.

Die Optimierung der zu verwendenden Menge geschieht durch Erstellung von Eichkurven mit gleichzeitigen Kontrollwerten, in denen das Bindungsprotein durch Puffer ersetzt wird. So kann der Anteil der freien Aktivität, der nicht an die Kohle gebunden ist, aber mitpipettiert wird, kontrolliert werden und als "background" abgezogen werden.

Die Nachteile dieses Verfahrens ergaben sich aus der schlechten Darstellbarkeit der Eichkurve in der einfach reziproken Auftragung, wobei meist ein Knick oder eine Krümmung auftrat. Weiterhin zeigten die Eichkurven trotz guter Präzisionen eine geringere Sensitivität als die mit der Filtermethode erreichte.

Außerdem ergab sich bei Messungen in biologischem Material, daß hierbei Komponenten auftraten, die die Bindung von

^3H cAMP an die Aktivkohle verminderten und zu einer Freigabe von sonst gebundener Aktivität in den Überstand führten. Dadurch war der "background" von Probe zu Probe verschieden, was also stets die Messung eines Kontrollwerts erfordert.

5. Probenaufbereitung zur Bestimmung der Extrazellulärkonzentrationen von cAMP mit der Proteinbindungsmethode

Die Aufbereitung von Urin- und Plasmaproben zur Messung von cAMP mit der beschriebenen Methode richtet sich nach dem Vorhandensein von Bestandteilen im biologischen Material, die die Bindung des Nucleotids an das jeweilige Bindungsprotein beeinflussen.

Urinproben brauchen nach übereinstimmenden Angaben in der Literatur nicht vorbehandelt oder gereinigt zu werden, auch ist eine Zugabe von Phosphodiesterase-Hemmstoffen (Methylxanthine, EDTA) nicht nötig, sofern die Proben möglichst bald tiefgekühlt werden. Wir konnten bei 24 h dauernder Lagerung von Harn bei Raumtemperatur keine Abnahme der cAMP Spiegel gegenüber sofort tiefgefrorenen Proben feststellen. Die Messungen werden direkt mit den verdünnten Urinen durchgeführt, die je nach Bedarf im Verhältnis 1 : 20 bis 1 : 40 verdünnt werden müssen, um die eingesetzte Menge an cAMP im optimalen Bereich der Eichkurve von ca. 1 - 5 pMol bestimmen zu können.

Die Messung der cAMP Spiegel im Urin war unabhängig von der eingesetzten Menge an Urin und vom Verdünnungsgrad. Zugegebene Mengen von unmarkiertem cAMP wurden quantitativ wiedergefunden.

Die Messung von cAMP im Serum unterliegt wesentlich größeren methodischen Schwierigkeiten. Hepariniertes Blut sollte sofort nach Abnahme zentrifugiert werden, um die korpuskulären Bestandteile, die hauptsächlich für den Abbau von cAMP verantwortlich sind, abzutrennen ($t/2 = 30 - 150 \text{ Min}/37^{\circ} \text{ C}$) (35).

Wir fanden, daß Serum, welches 60 Minuten bei Zimmertemperatur gestanden hatte, einen um 7% niedrigeren cAMP Spiegel aufwies als sofort nach Zentrifugation gefälltes Serum. Es empfiehlt sich daher ein sofortiges Einfrieren der Proben, wenn nicht eine weitergehende Reinigung der Serumproben erfolgt. Ein Zusatz von Phosphodiesterasehemmern erscheint nur bei Verzögerung des genannten Ablaufs notwendig. Die Zeit zwischen Blutabnahme und Einfrieren bzw. Fällung des Serums betrug nie mehr als 5 Minuten.

Über die Notwendigkeit weiterer Reinigungsschritte des Plasmas sind in der Literatur die Angaben widersprüchlich. Einige Autoren konnten cAMP direkt in deproteinierten Plasmaextrakten bestimmen, andere halten chromatographische Reinigungsverfahren für nötig (71, 72, 73).

Wir stellten fest, daß mit den üblichen Deproteinisierungsverfahren (Trichloressigsäure, Aethanol) im Plasma stets Faktoren erhalten blieben, die die Bindung von cAMP an die Proteinkinase veränderten. Es zeigte sich jedoch auch bei Verwendung verschiedener Bindungsproteinpräparationen, daß mit steigender Reinheit der Präparation und steigender spezifischer Aktivität der Proteine das Ausmaß der Interferenz zunahm und daß mit relativ rohen Präparationen einige dieser Effekte ausblieben.

So wurde bei einer Proteinkinasepräparation mit einer

Bindungsaktivität von 1000 pMol/mg, die keine Phosphorylierungsaktivität mehr zeigte, also wahrscheinlich ausschließlich Bindungsuntereinheit enthielt, eine ausgeprägte Interferenz eines Faktors aus Plasmaextrakten beobachtet, die bei einer anderen Präparation mit einer Bindungsaktivität von 44 pMol/mg (also ca. 1/20 der Aktivität) nicht beobachtet wurde.

Die Schwierigkeiten mit interferierenden Faktoren im Plasma traten nur bei Verwendung der hochgereinigten Bindungsproteincharge auf und beruhten auf folgendem:

- 1) Es war nicht möglich, ein cAMP-freies Plasma als Standard herzustellen, denn bei der Phosphodiesteraseinkubation persistierte stets ein kleiner cAMP Rest, der nicht spaltbar war. Durch Dialyse wurden die Eigenschaften des Extrakts in Bezug auf die Bindungsbeeinflussung stark verändert.
- 2) Das Ausmaß der Interferenz wechselte von Plasma zu Plasma und war abhängig von der eingesetzten Menge.
- 3) Eine Trennung von cAMP und interferierendem Faktor war durch Chromatographie nicht erreichbar.

Ist, wie bei Verwendung dieser Bindungsproteinpräparation, eine Entfernung des Faktors aus dem Serumextrakt nicht oder nur mit aufwendigsten Mitteln möglich, so bleibt nur die Erstellung "interner Standards" übrig.

Bei den Messungen von cAMP im Serum wurde folgender Extraktionsvorgang gewählt:

0,2 ml Serum in Eppendorf cups wurden mit 1 ml absolutem

Aethanol versetzt, kräftig durchmischt (Eppendorf-Rüttler) und 2 Minuten zentrifugiert. Vom Überstand wurden 0,6 ml in neue cups überführt und in einem Thermoblock bei 95° C unter leichtem Begasen bis zur Trockne eingeeengt. Die Rückstände werden in 0,1 ml Aqua dest. aufgenommen, sodaß die Menge des Extrakts der Serummenge entspricht.

Bei Einsatz verschiedener Mengen dieses Extraktes in den Bindungstest wurde bei geringen Mengen eine aktivierende, bei höheren Mengen eine inhibierende Wirkung auf die Bindung von ^3H cAMP an das Bindungsprotein beobachtet. Ähnliches Verhalten eines Gehirngewebeextraktes beschrieben Weller, Rodnight und Carrera (68). Eine Analyse des Faktors erfolgt in Kapitel III, Teil A, Abschnitt 6.

Führt man die Messung mit Mengen, bei denen die Inhibition überwiegt, durch, so erhält man stets durch die Inhibition der Bindung eine Vortäuschung einer zu großen cAMP Menge. Die Wiederfindung verschiedener exogen zugegebener Mengen von cAMP war unter diesen Bedingungen stets über 100%, wobei der Prozentsatz für den jeweiligen Extrakt (bei gleicher Einsatzmenge) charakteristisch und von der zugesetzten cAMP Menge unabhängig war. Jeder Zusatz von cAMP wurde also in einem konstanten Prozentsatz wiedergefunden. Daraus leitet sich die Möglichkeit ab, den gemessenen Wert für cAMP durch den Prozentsatz der Wiederfindungen zu korrigieren (Methode des Internen Standards).

6. Faktoren im menschlichen Blutserum, die die Bindungskapazität des cAMP-Proteinkinase-Systems verändern

Bei Verwendung der reinen Bindungseinheit-Proteinkinase im oben beschriebenen Testvorgang zeigte sich, daß neben Ionenstärke, pH und Temperatur noch andere Faktoren die Bindung von cAMP an das Bindungsprotein beeinflussen. Walsh et.al. (6) haben ein Inhibitorprotein der cAMP abhängigen Proteinkinase aus Skelettmuskel beschrieben. Weller, Rodnight und Carrera (68) isolierten ebenfalls einen interferierenden Faktor aus Gehirngewebeextrakten. Wir fanden bei Messungen im menschlichen Blutserum einen Faktor, der das cAMP-Proteinkinase-System im Sinne einer Affinitäts-erhöhung der Proteinkinase für die cAMP Bindung beeinflußt und so den Bindungstest zur Bestimmung von cAMP-Spiegeln im Serum stören kann (im folgenden "SMF = serum modulating factor" genannt).

Methoden

Das verwendete Bindungsprotein wurde, wie bereits beschrieben, aus Rinderherz nach der Methode von Miyamoto et.al. (62) präpariert, die nach Rubin et.al. (63) durch den DEAE-Cellulose-Schritt modifiziert wurde. Das teilweise gereinigte Präparat zeigte eine maximale Bindungskapazität von 1,06 nMol cAMP/mg Protein, besaß aber keine cAMP abhängige Phosphorylierungsaktivität mehr. Die Bindung von cAMP an das Protein wurde unter den oben beschriebenen Standardbedingungen gemessen:

50 mM Natriumacetat pH 4.0, 0,76 µg des Bindungsproteins, 1 pMol ^3H cAMP im Gesamtvolumen von 200 µl.

Eine Einheit des SMF wurde definiert als die Menge, die eine halbmaximale Aktivierung der Bindung von cAMP über den Kontrollwert unter Standardbedingungen bewirkt. Diese Definition entspricht der in der Michaelis-Menten-Kinetik üblichen Terminologie ($V_{\max}/2 = K_m$) (siehe Abbildung 9).

Zur Untersuchung der Beeinflussung der Phosphorylierungsaktivität durch SMF wurde eine cAMP abhängige Proteinkinase nach der Vorschrift von Miyamoto et.al. (62) präpariert und die Aktivität mit Histon F2b als Substrat gemessen, das nach Johns (74) aus Kalbsthymus gewonnen wurde.

In einem Endvolumen von 250 μ l enthielt das Testsystem folgende Komponenten: Natrium Cacodylat 125 μ Mol pH 6.5, γ - 32 P-ATP 25 μ Mol ($1,6 \times 10^6$ cpm), Theophyllin 1,25 μ Mol, Histon F2b 0,3 mg, Proteinkinase 56 μ g und, im Falle der Zugabe, cAMP $1,25 \times 10^{-11}$ Mol.

Die Reaktion wurde durch Zugabe von Proteinkinase gestartet und durch Fällung mit TCA (Endkonzentration 10%) gestoppt. Nach Zentrifugation wurde das gefällte Protein in 0,1 N NaOH wieder aufgelöst. Dieser Vorgang wurde dreimal wiederholt. Eine Probe der Lösung wurde dann in Bray'scher Lösung im Nuclear Chicago Mark II scintillation spectrometer ausgezählt.

Präparation von SMF aus menschlichem Serum

Wir verwendeten Sammelserum von jungen, gesunden Personen. Eine kleine Probe wurde über Nacht gegen Wasser dialysiert, um die gesamte SMF Aktivität zu bestimmen.

Schritt 1

Zum undialysierten Serum wurden drei Volumenteile 96% Aethanols zugesetzt und die Mischung nach 10 Minuten Rühren im Eisbad zentrifugiert. Der Überstand wurde getrocknet und mit einem Viertel des Ausgangsvolumens 20 mM Natriumacetat pH 4.0 gelöst.

Schritt 2 + 3

Diese Fraktion wurde zweimal mit gleichen Volumina wassergesättigtem Aethyläther und zweimal mit gleichen Volumina Chloroform/Aceton (1 : 1) zur Entfernung der Lipide extrahiert.

Schritt 4

Die wässrige Phase wurde zur Trockne eingedampft, mit dem gleichen Volumen Wasser aufgenommen und 30 Minuten bei 100° C erhitzt. Nach Zentrifugation wurde das im Überstand verbliebene Protein noch durch Zugabe eines TCA/HCl-Gemisches in einer Endkonzentration von 12%/0,2% gefällt. Nach 20 Minuten Zentrifugation bei 40 000 x g wurde das Sediment in einem kleinen Volumen destillierten Wassers aufgenommen und 14 Stunden gegen ein 2000-faches Volumen destillierten Wassers dialysiert, das zweimal gewechselt wurde. Diese Fraktion wurde für unsere Untersuchungen verwendet, Versuche einer weitergehenden Reinigung durch verschiedene chromatographische Methoden ergaben großen Aktivitätsverlust.

Ergebnisse mit SMF

Der Effekt der nicht dialysierten Serumfraktion (Schritt 1)

auf die Bindung von cAMP an das Bindungsprotein ist in Abbildung 9 im unteren Teil dargestellt.

Man erkennt, daß bei niederen Konzentrationen die Bindung von cAMP deutlich inhibiert ist, mit steigender Konzentration zunimmt, um bei noch weiterer Konzentrationssteigerung wieder abzunehmen. Diese Bindungskurve kann zwei verschiedenen, sich überlappenden Komponenten zugeschrieben werden: einer, die die Bindung von cAMP erhöht und einer anderen, die sie erniedrigt.

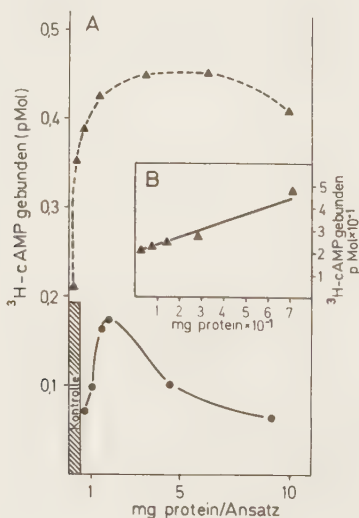


Abb. 9, Teil A

Bindung von ^3H cAMP bei verschiedenen Konzentrationen von dialysiertem $\blacktriangle$ ————— $\blacktriangle$ und nicht dialysiertem $\bullet$ ————— $\bullet$ menschlichen Poolserum (aus Schritt 1 Fraktion). Alle Reaktionen wurden unter Standardbedingungen gemessen (siehe Methoden).

Abb. 9, Teil B

Doppelt reziproke Auftragung der ^3H cAMP Bindung bei verschiedenen Konzentrationen von dialysiertem menschlichen Poolserum nach Lineweaver-Burk.

Wie in Abbildung 9 im oberen Teil dargestellt, veränderte die Dialyse der Schritt 1-Fraktion diese Bindungscharakteristik vollkommen. Jetzt zeigt sich eine dosisabhängige Stimulation der cAMP Bindung, die das typische Bild einer Sättigungskinetik aufweist.

Als Erklärung ist anzunehmen, daß durch Dialyse eine Komponente aus dem Serumextrakt entfernt wurde, die die Bindung von cAMP an das Bindungsprotein hemmt. Es zeigt sich also, daß zwei Faktoren im Serum vorliegen, die die cAMP-Bindung an das Bindungsprotein beeinflussen: der eine ist dialysabel, der andere nicht. Der dialysable Faktor wurde nicht weiter untersucht. Die Tatsache jedoch, daß er nach Veraschung immer noch vorhanden ist, zeigt, daß es sich um ein Ion handeln muß, das vielleicht einen unspezifischen Effekt auf das Bindungssystem ausübt.

Der nicht dialysable Faktor ist äußerst stabil. Er übersteht 30-minütiges Erhitzen bei 100° C ohne nennenswerten Aktivitätsverlust. Ausfällung des SMF ist möglich mit 12% TCA und Aethanol Konzentrationen über 60%. Der so gefällte SMF kann ohne Aktivitätsverlust in Wasser wieder aufgelöst werden. Ob es sich bei dem Faktor um ein Protein oder niedermolekulares Peptid handelt oder welcher Natur der Faktor sonst sein könnte, wurde nicht weiter untersucht.

Angaben über den Reinigungsgrad und die Wiederfindung bei jedem Schritt unserer Isolation des SMF sind in Tabelle 3 zusammengestellt.

Tabelle 3

Präparation des SMF aus menschlichem Serum
(Einzelheiten siehe Text)

Schritt	Volumen ml	Gesamtaktivi- tät (U)	Spez. Aktivität (U/mg Protein)	Anreicherungs- faktor
0	200	175 000	12,1	0
1	50	75 000	78,0	6,5
2	20	37 000	1 200,0	100
3	20	35 000	1 370,0	113
4	10	33 000	2 800,0	231

Bezogen auf die Aktivität der Fraktion 1 betrug der Anreicherungs faktor 231 bei einer Ausbeute von 44%. Der partiell gereinigte SMF bewirkt eine Aktivierung der Bindung in der gleichen Weise, wie in Abbildung 9 gezeigt. SMF selbst bindet kein ^3H cAMP und beeinflusst die Adsorption des Bindungsproteins an den Millipore Filter nicht. Dies läßt sich auch aus der Tatsache schließen, daß die durch SMF erhöhte Bindung auch in der von Brown et.al. (61) benutzten Methode der Kohlebindung nachweisbar bleibt.

Abbildung 10 zeigt eine doppelt reziproke Auftragung der gebundenen cAMP Mengen gegen die freien cAMP Mengen in der Art eines "Lineweaver-Burk plots". In Abwesenheit und in Gegenwart von maximal stimulierenden Mengen von SMF ergaben sich gerade Kurven über einen 50-fachen Konzentrationsbereich des cyclischen Nucleotids. Der Schnittpunkt beider Geraden mit der Ordinate liegt im selben Punkt, was anzeigt, daß SMF keine Erhöhung der maximalen Bindungskapazität bewirkt (1,06 nMol cAMP/mg Protein), sondern daß in Gegenwart von SMF die Affinität des Bindungsproteins für cAMP erhöht wird. So betrug die Dissoziationskonstante ohne SMF $7,1 \times 10^{-9}$ M und mit SMF $2,2 \times 10^{-9}$ M.

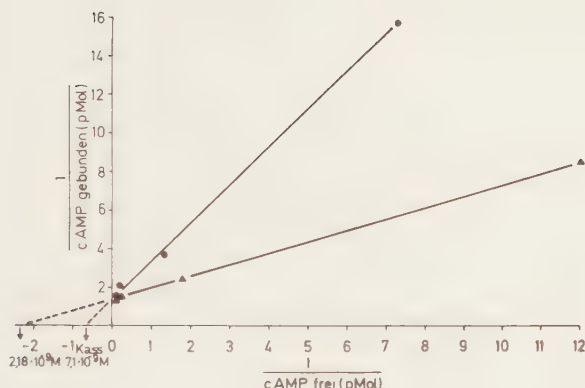


Abb. 10

Doppelt reziproke Darstellung der ^3H cAMP Bindung bei steigenden ^3H cAMP Konzentrationen und konstanter Menge an Bindungsprotein (0,76 μg). Gebundenes ^3H cAMP ist gegen freies aufgetragen.

- —● ohne Zugabe von SMF
 ▲ —▲ mit Zugabe von SMF (64,5 μg der Fraktion 4)

Die folgenden Versuche gelten der Frage der Wirkung von SMF auf die Aktivität der cAMP abhängigen Histonphosphorylierung durch Proteinkinase. Die Ergebnisse sind in Abbildung 11 dargestellt.

Wie man sieht, wird die Histonphosphorylierung durch 5×10^{-8} M cAMP in Abwesenheit von SMF etwa 20-fach stimuliert. In Gegenwart von SMF ist dieser Effekt auch bei Steigerung der cAMP Konzentration vollkommen verschwunden. Dabei scheint bemerkenswert, daß dieser Effekt nur nachweisbar ist, wenn SMF mit der Proteinkinase zusammen im Standardversuchsmedium (siehe oben) 30 Minuten bei 0°C vorinkubiert wird, wobei Histon und ^{32}P -ATP noch nicht im Medium vorhanden

sein dürfen. Wenn SMF direkt ohne Vorinkubation zum Versuchssystem zugegeben wurde, konnte keine Hemmung der cAMP abhängigen Phosphorylierung beobachtet werden.

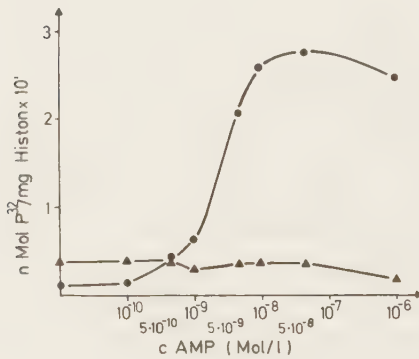


Abb. 11

Phosphorylierung von Histon F2b bei verschiedenen cAMP Konzentrationen.

● — ● ohne Zugabe von SMF

▲ — ▲ mit Zugabe von SMF (64,5 ug der Fraktion 4)

Versuchsbedingungen siehe unter Methoden. Die ³²P Inkorporation wurde nach 10 Minuten gestoppt.

Die Aktivität der Proteinkinase in Abhängigkeit von der SMF-Konzentration zeigt die Abbildung 12. Es zeigt sich, daß eine dosisabhängige Hemmung der cAMP abhängigen Proteinphosphorylierung durch SMF vorliegt. Im Gegensatz dazu wird die cAMP unabhängige Proteinkinaseaktivität durch SMF stimuliert, und zwar maximal (5-fach) bei einer SMF-Konzentration, die eine ungefähr 50%ige Hemmung der cAMP abhängigen Aktivität bewirkt.

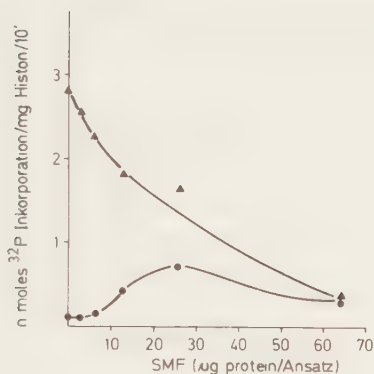


Abb. 12

Effekt von SMF auf die cAMP abhängige und die cAMP unabhängige Phosphorylierung von Histon F2b.

● — ● ohne Zugabe von cAMP

▲ — ▲ cAMP Konzentration konstant 5×10^{-8} M

Die ^{32}P Inkorporation wurde nach 10 Minuten gestoppt.

Welcher Natur der beschriebene Serumfaktor ist, erscheint noch unklar. Behandlung mit Trypsin ergab eine deutliche Reduktion seines Hemmeffektes auf die cAMP abhängige Proteinkinase, während der stimulierende Effekt auf die cAMP unabhängige Aktivität vollständig verschwand.

Die Trypsinbehandlung hatte ebenfalls eine Verminderung der Wirkung von SMF auf die cAMP Bindung (70%) zur Folge.

Tabelle 4

Effekt von SMF auf die cAMP abhängige und cAMP unabhängige Phosphorylierung von Histon F2b (in nMol 32 P/mg Histon x 10 Min.)

Zugabe	mit cAMP (5×10^{-8} M)		ohne cAMP	
keine	2,76	100%	0,124	100%
25 ug SMF	1,57	57%	0,73	490%
65 ug SMF	0,32	11,6%	0,36	190%
Trypsin Inkubation bei 25 ug SMF	2,62	95%	0,139	111%
Trypsin Inkubation bei 65 ug SMF	1,54	56%	0,12	97%

Der hier beschriebene Serumfaktor ist dem von Walsh et.al. (6) gefundenen Inhibitor aus Skelettmuskel sehr ähnlich, wie folgende Eigenschaften zeigen: Er ist nicht dialysabel, instabil gegenüber tryptischer Verdauung, hitzestabil und kann durch TCA und Aethanol ohne wesentlichen Aktivitätsverlust gefällt werden. Weiterhin hemmt er die cAMP-abhängige Proteinkinase aus Muskel, was mit verschiedenen Proteinsubstraten getestet wurde, und erhöht die Bindung von cAMP an die regulatorische Untereinheit der Proteinkinase.

Es erscheint erwähnenswert, daß unser Serumfaktor die Proteinkinaseaktivität in Abwesenheit von cAMP stimuliert. Dies steht im Gegensatz zu den Ergebnissen von Walsh et.al. (6), die keinen Effekt des Inhibitors auf die cAMP unabhängige Phosphorylierung von Casein beobachteten.

Wie unsere Untersuchungen zeigten, variieren die Konzentrationen von SMF von einem Serum zum anderen beträchtlich. Angesichts der Tatsache, daß bis jetzt keine Pro-

teinkinaseaktivität im menschlichen Blutserum gefunden wurde, bedarf die physiologische Bedeutung des SMF weiterer Untersuchungen. Vom analytischen Blickpunkt her betrachtet ist es offensichtlich, daß SMF in verschiedenem Ausmaß bei der Bestimmung von cAMP im Serum im Bindungstest interferiert. Wie bereits erwähnt, spielt hierbei jedoch der Reinheitsgrad und die Charakteristik der verwendeten Proteinkinase eine erhebliche Rolle. Diese Tatsache könnte die erhebliche Schwankungsbreite der Normwerte, die in der Literatur angegeben werden, erklären. Aus diesem Grund muß bei jeder Bestimmungsmethode eine genaue Standardisierung zum Ausschluß von interferierenden Faktoren vorgenommen werden.

7. Standardisierung der Serummessungen mit partiell gereinigtem Bindungsprotein

Präzision der Methode

Bei Verwendung einer Charge geringeren Reinigungsgrades aus einer zweiten Präparation des Bindungsproteins (spezifische Aktivität 44 pMol/mg Protein) konnten wir die oben beschriebenen Effekte der Bindungsbeeinflussung durch einen Serumextrakt aus Aethanol (1 Teil Serum, 5 Teile Aethanol) nicht wiederfinden:

Die gemessenen cAMP Konzentrationen lagen im Bereich der erwarteten Größenordnungen, exogen zugeführte cAMP Mengen wurden nahezu quantitativ wiedergefunden. Die Recovery lag bei 95% bis 100%.

Außerdem war die Bestimmung unabhängig von der eingesetzten Serummenge; die geringe Streuung von Mehrfachwerten war bei Einsatz größerer Mengen natürlich geringer, zum

ersten, weil man bei geringen cAMP Mengen in den ungünstigeren Bereich der Eichkurve gelangt, zum zweiten, weil sich bei Berechnung der Konzentrationen in nMol/l eine Streuung um den Mittelwert mit einem größeren Faktor multipliziert. Wir setzten zur Messung daher meist 100 μ l des Aethanolextraktes ein, da wir hier mit Mengen zwischen 1 - 4 pMol pro Ansatz zu rechnen hatten, also im günstigsten Eichkurvenbereich lagen.

Die Chromatographie des Serumextrakts (SE) über Al_2O_3 Säule (6 x 0,5 cm, äquilibriert mit 20 mM TRIS pH 7.6) ergab bei Messung im Eluat dasselbe Ergebnis wie die Messung direkt im Extrakt, ebenso wurden vor Chromatographie zugegebene cAMP Mengen im Eluat quantitativ wiedergemessen. Die Berücksichtigung des prozentualen Verlustes der Reinigung erfolgte durch vorangehende Erstellung eines Elutionsdiagrammes mit 3H markiertem cAMP. Die Recovery der Methode lag zwischen 95% und 100%. Hieraus ist ersichtlich, daß eine chromatographische Reinigung des SE nicht erforderlich ist. Die Elution erfolgte ebenfalls mit 20 mM TRIS pH 7.6.

Nachdem eine gute Präzision der Serummessung in Serie mit dieser Methode (VK ca. 5,5%) erreicht worden war, stellte sich die Frage nach der Richtigkeit der Messung. Hierzu wäre die Herstellung eines Serums, das alle Bestandteile außer cAMP enthält, notwendig. Dieses Serum müßte gegen die Eichkurve gemessen, den cAMP Spiegel Null ergeben, d.h. kein Serumbestandteil außer cAMP interferiert im Test unter diesen Bedingungen.

Verschiedene Versuche wurden hierzu unternommen:

- 1) Enzymatische Spaltung von cAMP zu 5'-AMP durch Vorinku-

bation von Serum oder SE mit Phosphodiesterase (PDE)

2) Behandlung von Serum und SE mit Aktivkohle (NORIT A 2g/ml SE), Zentrifugation und Messung im Überstand

3) Dialyse von Serum und SE

Ad 1)

In mehreren Versuchen zeigte sich, daß trotz Variation der Inkubationszeit (bis zu 24 Stunden) und der Phosphodiesterasekonzentration stets ein Rest von 30 - 50 % an cAMP persistierte. Dieser Meßwert könnte entweder dadurch zustande kommen, daß die Substratkonzentration von cAMP für die PDE zu niedrig ist (unterhalb der Assoziationskonstante K_m), oder daß das, was gemessen wird, kein cAMP mehr ist, also ein zu hoher Meßwert vorgetäuscht wird. Die Recovery lag auch bei den PDE behandelnden Seren im oben genannten Bereich.

Ad 2)

Die Inkubation mit Aktivkohle führte zu einem Restspiegel von nur 6% des Ausgangswertes an cAMP. Hierbei werden jedoch noch andere Bestandteile, wie Ionen, organische Verbindungen etc. adsorbiert, sodaß eine eindeutige Aussage nicht möglich ist.

Ad 3)

Die Dialyse des SE führt neben dem dialysablen cAMP ebenfalls zum Verlust von anderen Bestandteilen des zu messenden Mediums. Es zeigte sich jedoch im Gegensatz zur Messung mit der hochgereinigten Bindungseinheit, daß hier kei-

ne oder zumindest nur minimale Beeinflussung der Bindung von ^3H cAMP an die Proteinkinase durch den dialysierten Extrakt erfolgte. Eine Abhängigkeit von der Menge des zugegebenen dialysierten Extraktes war nicht nachweisbar.

Den Beweis, daß wir im Serumextrakt wirklich nur cAMP messen und daß der nach PDE Andauung verbleibende Anteil auch cAMP darstellt, konnten wir durch folgenden Versuch erbringen:

Identifizierung von Serum cAMP durch wiederholte Andauung mit PDE nach Chromatographie und Konzentrierung: Richtigkeit der cAMP Messung im Serum

Nach Ramachandran (75) gelingt die chromatographische Trennung von cAMP und 5'-AMP auf mit TRIS Puffer gewaschenen Al_2O_3 Säulen von neutralem pH. Wir führten die Trennung der beiden Nucleotide an Al_2O_3 Säulen (6 x 0,5 cm, äquibriert mit 20 mM TRIS Puffer pH 7.6) durch und verwendeten als Elutionsmittel für cAMP TRIS Puffer, für 5'-AMP 0,2 M Na_2HPO_4 . Bekannte Mengen bzw. Aktivitäten an markiertem cAMP und 5'-AMP wurden in 1 ml Serumextrakt auf die Säule gegeben. Die Chromatographie wurde mit TRIS Puffer (20 mM pH 7.6) begonnen und das Eluat jeweils in ml Portionen auffangen, ein aliquot entnommen und im Scintillationszähler gezählt. Nach 6 ml war cAMP zu 100% im Eluat nachweisbar, 5'-AMP dagegen nur zu 4,8%. Danach wurde auf 0,2 M Na_2HPO_4 als Elutionsmittel gewechselt, was 5'-AMP nach weiteren 11 ml zu insgesamt 95% erscheinen ließ. Das Elutionsdiagramm zeigt Abbildung 13.

Nach Charakterisierung der Elutionsverhältnisse wurde auf folgende Weise verfahren:

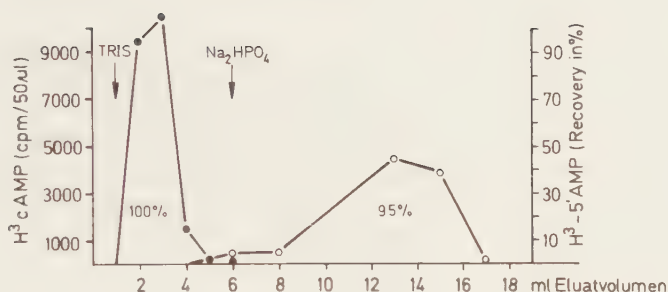


Abb. 13

Elutionsdiagramm von ^3H cAMP und ^3H 5'-AMP in Serumextrakten über Al_2O_3 -Säulen (6 x 0,5 cm, äquilibriert mit 20 mM TRIS Puffer pH 7.6).

Als Elutionsmittel für cAMP wurde bis zu 6 ml Eluat TRIS-Puffer verwendet. Anschließend 0,2 M Na_2HPO_4 zur Elution des 5'-AMP (nach Ramachandran (75)). Hierbei erschien ^3H -cAMP ●—● zu 100% bis zum 6. ml, ^3H 5'-AMP ○—○ zu 95% nach weiteren 11 ml.

Zu 1 ml Serumextrakt wurde in einem Fall 100 pMol unmarkiertes cAMP, im anderen 80 pMol unmarkiertes plus 20 pMol ^3H cAMP (430 000 cpm) zugegeben und die Extrakte wurden 16 Stunden mit PDE inkubiert. Nach Hitzeinaktivierung der PDE wurden beide Extrakte wie oben beschrieben mit TRIS Puffer chromatographiert. Hierdurch wurde das noch enthaltene cAMP zu 100 % eluiert, das entstandene Produkt der Andauung, 5'-AMP, retiniert und abgetrennt.

So fand sich bei Auszählung eines aliquots des radioaktiven Eluats, daß noch 49,5 % des radioaktiven (und somit

des gesamten) cAMP die Spaltung überstanden hatten. Bei Fortsetzung der Elution mit Na_2HPO_4 erschien dann der Rest der Gesamtaktivität im 5'-AMP zugeordneten "peak".

Aus dem unmarkierten Eluat wurden 100 μl entnommen und im Bindungstest ausgemessen. Hier fanden sich von den 100 pMol ebenfalls ca. 50% wieder. Beide Eluate wurden jetzt lyophilisiert und in der Hälfte des Volumens bidestillierten Wassers aufgenommen. Das Produkt wurde wiederum 16 Stunden, wie oben, mit PDE inkubiert und wie beschrieben rechromatographiert. Die Scintilationszählung und Bestimmung im Bindungstest ergab jetzt einen weiteren Abbau auf 2 - 6 % des Ausgangswertes. Eine weitere Einengung des Eluats wäre sinnlos, weil die dadurch entstehenden hohen Salzkonzentrationen den Bindungstest gestört hätten. Diese Möglichkeit wurde durch paralleles Mitlaufen eines Leerwertes von 1 ml Aqua bidest. mit hitzeinaktivierter PDE bei jedem Arbeitsgang und Einsatz einer entsprechenden Menge bei Erstellung der jeweils notwendigen Eichkurve zur Eluatmessung kontrolliert. Das Eluat beeinflusste den Test bis zum letzten Schritt nicht. Der nach PDE Andauung gemessene Restwert zeigte also die gleiche Elutionscharakteristika wie cAMP, wurde durch Entfernung des Reaktionsproduktes (5'-AMP) und Konzentrierung wieder durch PDE angreifbar und somit als cAMP identifiziert. Möglicherweise liegt der Tatsache, daß bei der Andauung von cAMP stets ein Rest persistierte, eine feedback-Hemmung der PDE durch 5'-AMP zugrunde.

Einfluß verschiedener Nucleotide auf die cAMP-Bindung

Abbildung 14 zeigt den Einfluß von steigenden Konzentrationen an cAMP, Dibutyryl-cAMP, cGMP und ATP auf die Bindung ^3H -markierten cAMPs an eine partiell gereinigte Proteinkinase aus einer anderen Präparation. Wie aus der beid-

seits log. Auftragung zu ersehen ist, beeinflussen DB-cAMP und cGMP die cAMP Bindung erst in Konzentrationen, die ca. 2 Zehnerpotenzen über den benötigten cAMP-Konzentrationen liegen, ATP beeinflusst die cAMP Bindung erst in Konzentrationen, die um ca. das 5 000-fache über den benötigten cAMP-Konzentrationen liegen. Die in vivo extrazellulär vorkommenden Konzentrationen der beiden physiologischen Nucleotide beeinflussen daher den Test nicht, sodaß eine Abtrennung dieser Substanzen nicht nötig ist.

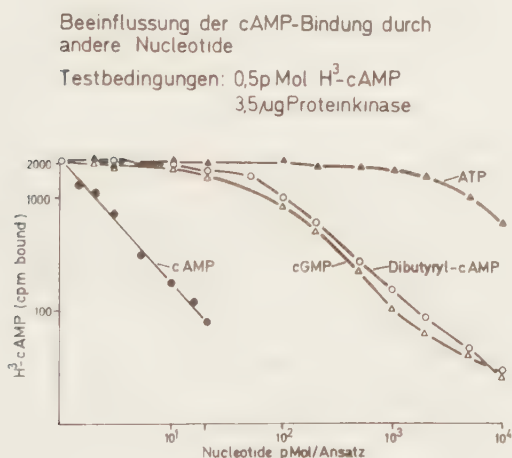


Abb. 14

Einzelheiten siehe Text

8. Erstellung von Normalwerten für cAMP in Serum und Urin

a) Serum cAMP Spiegel

Bei 54 Probanden beiderlei Geschlechts, die vom klinischen Aspekt her als gesund zu bezeichnen waren, wurden Blutproben nach 12 Stunden Nüchternheit entnommen und wie beschrieben auf ihren Gehalt an cAMP im Bindungstest untersucht.

Trägt man die Häufigkeit der vorkommenden Meßbereiche gegen die cAMP Spiegel im Plasma auf, so zeigt sich, daß hierbei keine Normalverteilung mit symmetrischer Streuung um einen Mittelwert vorzuliegen scheint (Abb. 15). Es handelt sich wahrscheinlich um eine log. Verteilung mit steil abfallender Häufigkeit zu niedrigeren und flacher abfallender Häufigkeit zu höheren Serumspiegeln mit einem Maximum bei Plasmawerten zwischen 15,0 und 17,9 nM/l. Die Angabe eines arrhythmischen Mittelwertes ist somit aus statistischen Gründen nicht möglich.

Häufigkeitsverteilung von gemessenen
Serum cAMP Spiegeln

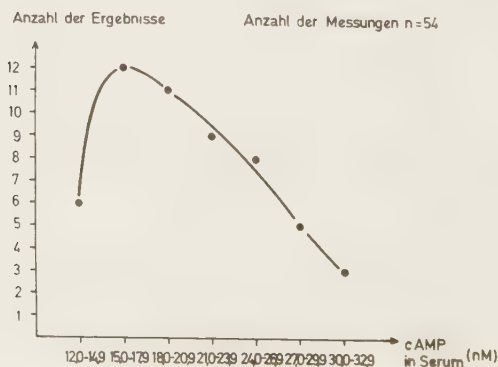


Abb. 15

b) cAMP im Urin

Bei 34 gesunden jungen Probanden (Laborpersonal und Studenten) wurden cAMP-Bestimmungen im 24 h Sammelurin vorgenommen. Das Durchschnittsalter des Kollektivs lag bei 27 Jahren, 19 Frauen und 15 Männer. Der Sammelurin wurde ohne jeglichen Zusatz gesammelt und bis zur Bestimmung ein aliquot eingefroren. Mit der cAMP-Bestimmung wurde auch eine Bestimmung der Creatininausscheidung im 24 h Sammelurin durchgeführt und die Ausscheidung beider Metabolite aufeinander bezogen.

Die Gesamtausscheidung für cAMP/24 h lag zwischen 2.4 - 7.7 uMol/24 h Mittelwert 5.1 uMol/24 h. Die Ausscheidung an cAMP scheint statistisch normal verteilt zu sein. Bezogen auf die Creatininausscheidung ergaben sich 1.6 - 5.3 uMol cAMP/g Creatinin.

Die angegebenen Werte sind in Übereinstimmung mit den von anderen Autoren ermittelten Daten.

B) Klinischer Teil

1. Untersuchung über Plasmakonzentration und renale Ausscheidung von cAMP bei chronischen Hämodialysepatienten

Patienten mit chronischem Nierenversagen entwickeln als Antwort auf die hierbei entstehende chronische Hypocalcämie und Hyperphosphatämie häufig einen sekundären Hyperparathyreodismus. Die Niere ist auf der anderen Seite eines der Erfolgsorgane des Parathormons, dessen Wirkung über die Bildung von cAMP durch Stimulierung der renalen Adenylatcyclase vermittelt wird. Veränderungen der cAMP Spiegel in Plasma und Urin nach PTH Gabe beim Gesunden sind allein auf die hormonbedingte renale Mehrproduktion des Nucleotids zurückzuführen, obwohl PTH noch an anderen Erfolgsorganen, wie Knochen und Darmtrakt seine Wirkung entfaltet. 30 - 50 % des ausgeschiedenen cAMP im

Urin sind unter Normalbedingungen Parathormon bedingt und entstammen der Niere selbst, während ein nur geringer Anteil des Plasma cAMP Spiegels durch PTH bedingt zu sein scheint. Über Bildung und Ausscheidung bzw. Plasmaclearance von cAMP im Zustand der chronischen Niereninsuffizienz bei bestehenden erhöhten PTH Spiegeln im Sinne eines sekundären Hyperparathyreoidismus ist wenig bekannt. Ziel dieser Untersuchung war die Bestimmung der Plasmaspiegel und Urinausscheidung von cAMP und deren Beeinflussung während der Hämodialyse. Bei diesen Patienten konnte aufgrund des terminalen Nierenversagens mit entsprechenden Plasma Ca- und P-Werten das Vorliegen eines sekundären Hyperparathyreoidismus angenommen werden.

Methoden *

Die Untersuchungen wurden an 13 Patienten mit chronischem Nierenversagen unterschiedlicher Genese durchgeführt, die sich zweimal wöchentlich einer stationären Hämodialyse unterzogen. Die Dauer der Dialysebehandlung betrug nahezu regelmäßig 6 Stunden, die Dialysatdurchflußmenge lag um 600 ml/min. Vor Beginn der Dialysebehandlung sammelten die Patienten einen 24 h-Urin, dessen Volumen registriert wurde (Bezeichnung B_1). Unmittelbar nach der Dialyse erfolgte die Gewinnung einer zweiten Urinprobe (B_2). Blutabnahmen erfolgten unmittelbar vor Dialysebeginn (A_1), nach 3 Stunden Dialysedauer (A_2) und schließlich am Ende der Dialyse nach 6 Stunden (A_3). In den Urin- und Plasmaproben wurden Kreatinin, Harnstoff, Harnsäure, Calcium, Magnesium und das anorganische Phosphat bestimmt. Die Messung von cAMP erfolgte anhand der beschriebenen Methode.

Ferner wurde stündlich eine Probe aus dem durchgeflossenen Dialysat entnommen.

Fußnote * siehe Anhang Tabelle 7

Eine Einteilung der Patienten wurde nach dem Grad der Ausscheidungsfunktion vorgenommen, sodaß sich folgende Gruppen ergaben: *

- 1) Patienten mit polyurischer Phase (>1000 ml/24 h)
- 2) Patienten mit Oligurie ($400-1000$ ml/24 h)
- 3) Patienten mit Oligurie-Anurie (< 100 ml/24 h)

Das Serumkreatinin der Patienten bewegte sich zwischen 6,6 und 15,1 mg%, die endogene Kreatinin Clearance lag zwischen 0,05 und 8,2 ml/min.

Resultate und Diskussionen

Vor Beginn der Dialyse lagen die cAMP Plasmakonzentrationen bei 6 der Patienten im Bereich der in der Literatur angegebenen (Tabelle 1) und auch von uns gefundenen Norm. Lediglich zwei der Patienten wiesen mit 28,5 nM bzw. 35,5 nM im oberen Normbereich liegende Plasmaspiegel auf (I, III), während drei Patienten (II, V, XIV) Werte unterhalb der Norm zeigten. Eine vermehrte Sekretion von PTH im Sinne eines sekundären Hyperparathyreoidismus ist also bei keinem Patienten am Plasma cAMP Spiegel abzulesen (Anhang Tabelle 5 und 7). Obwohl der Anteil der verschiedenen Organe an der Plasmaproduktionsrate unbekannt ist, ließ sich, wie bereits erwähnt, die Niere unter PTH Stimulation als Produzent identifizieren. Unter physiologischen Bedingungen dürfte jedoch der renale Anteil am Plasma cAMP nur gering sein. Ein partieller oder totaler Ausfall der PTH-sensitiven Adenylatcyclase im proximalen Tubulus könnte die normalen bzw. subnormalen Plasma cAMP Spiegel trotz erhöhter PTH Sekretion erklären.

Fußnote* siehe Anhang Tabelle 6

Die ermittelten Werte erscheinen noch aus einem anderen Grunde erstaunlich. Ich fand, daß die renale Ausscheidung von cAMP bei allen Patienten drastisch eingeschränkt ist. Die chronisch Niereninsuffizienten zeigten eine Gesamtausscheidung von 0,02 - 0,57 $\mu\text{Mol}/24 \text{ h}$ (Normbereich 2 - 7 $\mu\text{Mol}/24 \text{ h}$), also ungefähr 1/10 bis 1/100 der normalen 24h-Ausscheidung. Dies müßte theoretisch zu einem Anstau des cyclischen Nucleotids im Plasma führen. Daß dies nicht der Fall ist, könnte durch gesteigerte Elimination von cAMP aus dem Plasma auf anderen Wegen beruhen (siehe Kapitel Kinetik).

Unter Normalbedingungen wird cAMP zu 20% durch glomeruläre Filtration aus dem Plasma entfernt (35). Die verbleibenden 80% verschwinden auf noch weitgehend unbekannte Weise aus dem Plasma. Tracerstudien an Hunden ergaben, daß die Leber bis zu 25% und die Nieren bis zu 10% des cAMP aus dem Plasma aufnahmen und rasch metabolisierten (36).

Die Kompensation der stark eingeschränkten glomerulären Elimination von cAMP bei chronischer Niereninsuffizienz kann demzufolge entweder auf eine Steigerung der metabolischen Clearance bei bestehender Nierenschädigung (wohl vorwiegend extrarenal), oder aber auf eine Drosselung der Produktionsrate zurückzuführen sein. Dies könnte im chronisch urämischen Zustand durch Hemmung eines aktiven Transportes des Nucleotids von intra- nach extrazellulär, der zumindest für einige Gewebe diskutiert wird (12), erfolgen. Auch eine Hemmung der Adenylatcyclaseaktivität und/oder Überwiegen der PDE im Rahmen der allgemein katabolen Stoffwechselsituation wäre denkbar.

Die starke Einschränkung der renalen Ausscheidung von cAMP

erwies sich als vom Grad der Diurese unabhängig (siehe Anhang Tabelle 5 und 6). Die Höhe der Einschränkung zeigt, daß hierfür nicht nur die massive Verminderung der glomerulären Filtrationsrate (GFR) verantwortlich ist, sondern daß auch der vom proximalen Tubulus im Sinne der tubulären Sekretion an den Harn abgegebene, PTH bedingte Anteil erniedrigt ist. Die Tatsache, daß Patienten mit chronischen Nierenerkrankungen signifikant niedrigere Mengen von cAMP ausscheiden, wurde bereits früher von Taylor et al. (22) und Estep et al. (21) und von Chase et al. (20) beobachtet.

Erstaunlich scheint, daß selbst bei den Patienten, die in der polyurischen Phase große Urinvolumina ausscheiden, die cAMP Gesamtausscheidung und Clearance stark erniedrigt ist. Dies zeigt, daß die in diesem Stadium manifeste tubuläre Funktionsstörung auch die PTH bedingte cAMP Bildung und Sekretion im proximalen Tubulus erfaßt und zusammen mit der glomerulären Funktionsstörung die Ausscheidungsminderung des Nucleotids zur Folge hat.

In allen Fällen jedoch läßt sich eine geringere Einschränkung der cAMP Clearance als der Kreatininclearance feststellen (siehe Anhang Tabelle 6). Dies weist auf eine länger bestehende Restfunktion des Tubulussystems im Verhältnis zur glomerulären Funktionseinbuße hin. Je nach Grad und Lokalisation der Nierenschädigung ergeben sich somit unterschiedliche Quotienten der Clearance von cAMP : Kreatinin.

Ferner zeigte sich eine Korrelation zwischen cAMP und Kreatinin Clearance mit einem Korrelationskoeffizienten von $r = 0,7156$. Folgende weitere Korrelationen wurden berechnet:

cAMP Clearance / Calciumclearance	r = 0,687
cAMP Clearance / Phosphatclearance	r = 0,724
Calciumclearance / Phosphatclearance	r = 0,8836

Die Plasma cAMP Konzentrationen ließen sich vor Beginn der Dialyse mit den folgenden Parametern nicht korrelieren:

Plasmakonzentration von Calcium, Phosphat, Magnesium, sowie den Quotienten aus Calcium/Phosphat und Calcium/Magnesium.

Veränderungen während der Dialyse

Daß es sich bei den gemessenen cAMP Spiegeln nicht um einen fixierten Zustand handelt, zeigen die Veränderungen während der Dialyse an. Bei sechs der Patienten kam es während der sechsständigen Dialyse zu einem Anstieg des Plasma cAMP, in einem Fall auf einen Wert hoch über der Norm (siehe Anhang Tabelle 7). Dies ist umso erstaunlicher, als das Plasma cAMP die Dialysemembran leicht permeiert und somit ein hoher Efflux von cAMP in die Dialysierflüssigkeit zu erwarten ist. Aufgrund der hohen Flußraten im System (ca. 600 ml/min.) und der daraus resultierenden extremen Verdünnung ließ sich cAMP in der Dialyseflüssigkeit auch nach mehrfacher Konzentrierung nicht nachweisen. In vitro-Versuche mit ^3H markiertem cAMP zeigten aber eindeutig, daß die Dialysemembran keine Barriere für den Durchtritt des Nucleotids darstellt. Der Ausschwemmung in die Dialyseflüssigkeit müssen demnach höhere Produktionsraten gegenüberstehen, um die Plasmaspiegel des Nucleotids aufrechtzuerhalten, oder gar zu erhöhen.

Gleichzeitig wurde bei allen Patienten während der Dialyse ein deutliches Absinken der renalen cAMP Ausscheidung beobachtet, sowohl wenn man die während sechsstündiger Dialyse ausgeschiedenen cAMP Mengen auf eine 24h-Ausscheidung hochrechnet, als auch bei Vergleich der Ausscheidung in $\mu\text{Mol cAMP/g Kreatinin}$ bei B_1 und B_2 (siehe Anhang Tabelle 7).

Die Dialyseflüssigkeit enthielt 3,0 mval/l Calcium, was zu Anstiegen des Serumcalcium um durchschnittlich 0,4 mval/l führte ($\bar{x} A_1 = 4,73 \text{ mval/l}$, $\bar{x} A_3 = 5,12 \text{ mval/l}$). Dies müßte theoretisch zu einer Suppression einer erhöhten PTH Sekretion führen, was in Übereinstimmung mit dem Absinken der Urinausscheidung von cAMP steht (siehe Anhang Tabelle 7). Die Erhöhung der Produktionsraten von cAMP im Serum läßt sich hierdurch jedoch nicht erklären. Es müssen ihr andere, eventuell durch den Dialysevorgang bewirkte, Veränderungen zugrundeliegen. Eine Korrelation zwischen den Veränderungen der Serum cAMP Spiegel und denen des Calcium - und Phosphatspiegels lag nicht vor.

Die Diagnose eines bestehenden sekundären Hyperparathyreoidismus ist durch die Bestimmung des Serum cAMP nach diesen Beobachtungen nicht möglich. Schmidt-Gayk et.al.(85) fanden selbst bei Patienten mit primärem Hyperparathyreoidismus normale Plasma cAMP Spiegel bei erhöhten Urinausscheidungen des Nucleotids. Ist eine chronische Niereninsuffizienz mit ihren komplexen Stoffwechselveränderungen Ursache des sekundären Hyperparathyreoidismus, so manifestiert sich eine erhöhte PTH Sekretion nicht in einer vermehrten Urinausscheidung von cAMP, da hierbei die Quelle des cyclischen Nucleotids, die Niere selbst, geschädigt ist. Allenfalls könnte durch die cAMP Bestimmung im Urin eine beginnende Niereninsuffizienz, auch im Stadium der Polyurie,

an der stark verminderten Ausscheidung des cyclischen Nucleotids erkannt werden. Ob sich Nierenkrankheiten unterschiedlicher Genese und Lokalisation (Glomerulonephritis, Pyelonephritis) durch Veränderungen hinsichtlich der cAMP Ausscheidung unterscheiden, ist nicht bekannt und bleibt weiteren Untersuchungen vorbehalten.

2. Verhalten von cAMP und anderen Parametern in Plasma und Urin nach Gabe von Parathormon

Methoden

Zwei gesunde männliche Probanden im Alter von 23 und 26 Jahren, Gewicht ca. 70 kg, die 12 Stunden vor Versuchsbeginn nüchtern geblieben waren, sammelten einen 12 h-Urin über Nacht zur Bestimmung der Basalbedingungen. Während der ganzen Untersuchung wurden die Probanden auf einer Liege ruhig in Rückenlage gehalten, um eventuell störende orthostatische Einflüsse auszuschalten. Wegen des Infektionsrisikos wurde auf Katheterisierung verzichtet, zur Messung wurde Spontanurin verwendet. Der zeitliche Ablauf wurde mit einer Stoppuhr kontrolliert und Urinmenge und Zeit protokolliert. Zur Blutabnahme und Injektion wurden zwei Braunülen in die Brachialvenen gelegt, wobei Injektion und Abnahme kontralateral erfolgte.

Proband A erhielt nach Abnahme einer Blutprobe und nach Entleerung der Blase 200 USP Parathormon injiziert (Zeitpunkt 0 bei A in Abb. 16, 18, 19). Danach wurden auf der anderen Seite Blutabnahmen in einminütigem Abstand bis zur zehnten Minute, dann in zehnminütigem Abstand bis zur vierzigsten Minute und schließlich in ca. 30 Minuten Ab-

stand bis zum Ende des Versuches nach 240 Minuten vorgenommen. Spontanurin wurde in kurzmöglichsten Abständen entleert.

Proband B erhielt nach Abnahme von zwei Ausgangswerten und Gewinnung einer Urinprobe eine Calciuminfusion (33 mg Ca/kg KG x h) über 130 Minuten in einem Gesamtvolumen von 500 ml (1%ige Lösung). Der Beginn der Calciuminfusion ist in den Abbildungen 17, 20 und 22 dem Zeitpunkt 0 zugeordnet. In den ersten 70 Minuten der Infusion wurden fünf Blutabnahmen vorgenommen und zwei Urinproben gewonnen. Nach der letzten Urinprobe wurden in der 70. Minute 200 USP Parathormon* intravenös verabreicht und Blutabnahmen analog zum Vorgehen bei Proband A getätigt.

Nach 130 Minuten wurde die Calciuminfusion beendet und durch eine Infusion von 0,9%iger NaCl-Lösung mit gleicher Volumenzufuhr (220 ml/Std.) ersetzt, um Kontinuität der Verhältnisse zu wahren. In der 250. Minute erfolgte eine zweite Injektion von 200 USP Parathormon und Blutabnahmen wurden in analoger Weise bis zur 300. Minute vorgenommen. Spontanurin wurde in kurzmöglichsten Abständen gewonnen, es wurde jedoch darauf geachtet, die PTH-Injektionen direkt auf eine möglichst vollständige Blasenentleerung folgen zu lassen.

In den Serum- und Urinproben wurde cAMP nach der beschriebenen Methode bestimmt, weiterhin die Elektrolyte Natrium, Kalium, Calcium, Magnesium, das anorganische Phosphat und das Kreatinin. Zur Berechnung der Clearanceraten wurden durch Planimetrie bestimmte Mittelwerte der jeweiligen Serumspiegel ermittelt.

Fußnote* Wir verwendeten bei unseren Versuchen ein bovines Parathormon (PTH) der Firma Hormon-Chemie, das in Anlehnung an eine Methode nach Aurbach hergestellt wird (J.Biol.Chem.234, 3179 (1959)). Aktivität 500 bis 1000 E/mg. Standardisierung im Radioimmunoassay nach Arnaud et.al. (J.Clin.Invest.50, 21 (1971)) und im Bioassay nach Aurbach(Endocrinology 64,296).

Beschreibung der Ergebnisse

a) Verhalten von cAMP

Nach Injektionen von 200 USP PTH (Parathormon) stieg der cAMP Spiegel im Serum bei A (siehe Abb. 16) von 30 nMol/l auf 89,8 nMol/l an (ca. 3-fach). Das Maximum des Anstiegs lag in der 7. Minute nach der Injektion. Nach 20 Minuten kehrte der cAMP Spiegel auf Werte um 40 nMol/l zurück. Dieser Wert hielt sich gleichbleibend bis zu 40 Minuten. Nach einer Stunde war wieder der Ausgangsspiegel von 25 - 30 nM erreicht, der von nun an während der gesamten Versuchsdauer konstant blieb.

Im Urin konnte in der ersten 15-Minuten-Portion ein ca. 40-facher Anstieg der cAMP-Ausscheidung von 1,97 auf 79,7 uMol cAMP/g Kreatinin registriert werden. In den nächsten 15 Minuten war die Ausscheidung mit 15,4 uMol cAMP/g Kreatinin noch weit über dem Ausgangswert, um nach insgesamt 30 Minuten mit 3,1 uMol/g Kreatinin wieder den Normbereich zu erreichen. Dieser Wert blieb bis zu Versuchsende nahezu konstant (siehe Anhang Tabelle 8).

Das Verhältnis der cAMP Clearance zur Kreatinin Clearance (hier vereinfachend der glomerulären Filtrationsrate gleichgesetzt) stieg von 0,8 auf 8,9, fiel dann auf 3,87, um sich für den Rest des Versuches auf Werte zwischen 0,86 und 0,94 einzustellen (siehe Anhang Tabelle 8).

Bei Proband B (siehe Abb. 17) konnten während der Calciuminfusion keine signifikanten Bewegungen des cAMP Spiegels im Serum beobachtet werden. Die cAMP Ausscheidung jedoch fiel von 2,88 uMol cAMP/g Kreatinin auf 1,72 uMol/g Kreatinin, also um ungefähr 40%. Der Clearance Quotient cAMP : Kreatinin sank von 1,46 auf 0,84 (siehe Anhang Tabelle 8).

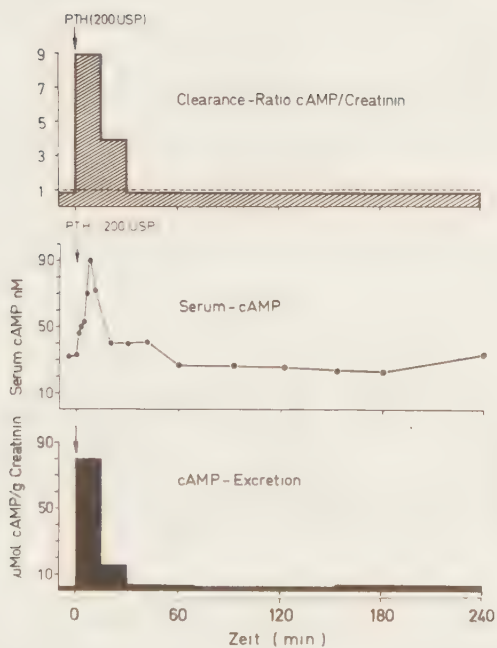


Abb. 16

Veränderungen von Serum cAMP und cAMP Ausscheidung im Urin nach intravenöser Gabe von 200 USP PTH bei Proband A.

Methoden und Einzelheiten siehe Text.

Die während der Calciuminfusion stattfindende Injektion von 200 USP PTH zeigte analoges Verhalten von cAMP in Serum und Urin wie bei A beobachtet (Abb. 17). Im Serum stieg cAMP von 15,3 nMol/l auf 51,3 nMol/l (ca. 3,5-fach) an, der höchste Anstieg wurde in der 9. Minute nach Injektion registriert. In der 20. Minute lag cAMP wieder bei 21,6 nMol/l, um über eine kleine Nachschwankung auf 26,2 nMol/l in der 30. Minute am Ende der Calciuminfusion (60. Minute) wider 19,3 nMol/l zu erreichen. In den folgenden 80 Minuten erfolgte ein protrahierter kontinuierlicher Abfall des Serum cAMP bis auf den Tiefstwert von 9,6 nMol/l.

Die Urinausscheidung (siehe Anhang Tabelle 8) schnellte von 1,72 auf 138 uMol cAMP/g Kreatinin (ca. 80-fach) in den ersten 13 Minuten nach der PTH Injektion. Die nächsten 20 Minuten betrug sie 13,1 uMol/g Kreatinin und fiel dann bis zur 180. Minute nach Injektion auf 1,45 uMol/g Kreatinin ab, also noch unter den Ausgangswert vor PTH Gabe.

Das Clearance Verhältnis cAMP : Kreatinin stieg von 0,84 auf 19,4, fiel dann auf 3,8, um nach 33 Minuten wieder den Wert von 0,82 zu erreichen (siehe Abb. 17 und Anhang Tabelle 8).

Die zweite Injektion von 200 USP PTH (180 Minuten nach der ersten) ließ das Serum cAMP von 15,2 nMol/l nur auf 32,3 nMol/l ansteigen; dieses Maximum wurde wie bei der ersten Injektion in der 9. Minute beobachtet, jedoch wurde jetzt der Ausgangswert bereits nach 12 Minuten wieder erreicht.

Analog dazu stieg die Urinausscheidung jetzt von 1,45 nur auf 49,1 uMol cAMP/g Kreatinin (allerdings bei einem Meß-

zeitraum von 18 Minuten). Dafür blieb die cAMP Ausscheidung länger erhöht: bis zur 45. Minute betrug sie immer noch 4,26 $\mu\text{Mol/g}$ Kreatinin (siehe Anhang Tabelle 8).

Das Clearance Verhältnis cAMP : Kreatinin stieg auf 11,4.

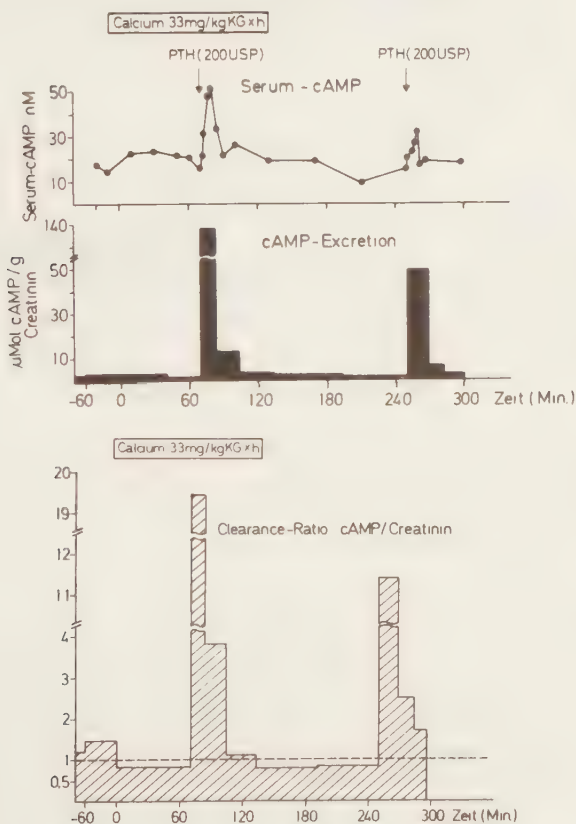


Abb. 17

Veränderungen von Serum cAMP und cAMP Ausscheidung im Urin durch intravenöse Gabe von je 200 USP PTH während und nach einer Infusion von Calciumglukonat bei Proband B (33mg/kg Körpergewicht x Stunde). Der Zeitpunkt 0 in den Abb. ist dem Beginn der Ca-Infusion zugeordnet. Dauer 130 Min., danach Fortsetzung der Infusion mit 0,9% NaCl zur Kontinuität der Volumenzufuhr (220 ml/Std.) bis Versuchsende.

b) Verhalten der anderen Parameter

(siehe Anhang Tabellen 9 und 10, Abbildungen 19 bis 22)

Bei beiden Probanden zeigte sich nach PTH Gabe eine sofortige Zunahme der Kreatinin Clearance von 30 - 40 % bei B und von 80 % bei A in den ersten 15 - 30 Minuten nach Injektion (Abb. 18). Bei A stieg die Kreatinin Clearance von 107 ml/min. auf 192 ml/min. in den ersten 15 Minuten, um danach bis zur 120. Minute auf Werten zwischen 130 - 140 ml/min. zu verbleiben. Erst nach 2 Stunden bestanden wieder Ausgangsverhältnisse. Die bereits vor Hormongabe höhere Clearance (160 ml/min.) bei B stieg um 30% bzw. 40% und blieb ca. eine Stunde lang erhöht. Die Darstellung der Ausscheidungswerte der anderen Parameter in Bezug zur Kreatininausscheidung ändert jedoch nur wenig am zeitlichen Ablauf der unten beschriebenen Vorgänge und wurde deshalb nicht aufgeführt.

Die Kreatininspiegel im Serum bleiben konstant.

Natrium und Harnvolumen

Als Soforteffekt auf die PTH Injektion setzt in beiden Fällen eine Zunahme der Natriumclearance auf das 6,8-fache (A) bzw. das 2,9-fache (B1) und 2,5-fach (B2) ein. Diesen Effekt begleitet eine synchrone Zunahme des Harnvolumens. Beide Effekte haben ein sofortiges Maximum in den ersten 15 Minuten und sinken parallel zur cAMP Ausscheidung ab. Der Anstieg der Natrium und Wasserausscheidung bis zur 70. Minute bei B ist Folge der Infusion.

Das Serumnatrium blieb konstant (siehe Anhang Abb. 21,22).

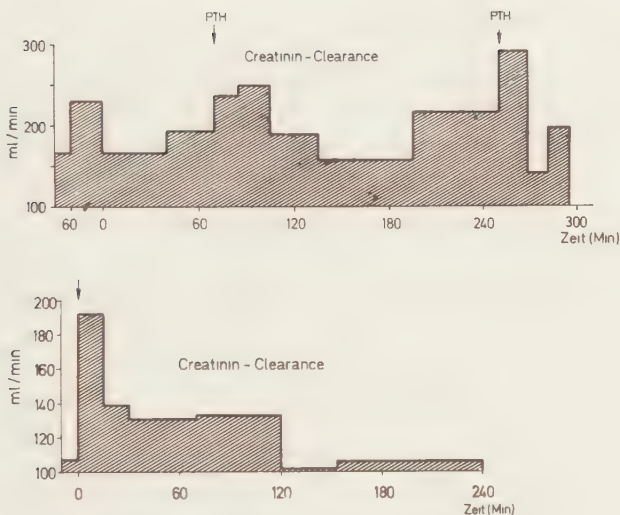


Abb. 18

Veränderung der Creatinin Clearance durch die intravenöse Gabe von PTH bei Proband A und B.

Kalium

Ähnlich verhält sich die Kaliumausscheidung: Anstieg der Clearance auf das 14-fache (A) bzw. das 3,5-fache (B). Bezieht man die Kaliumausscheidung auf Kreatinin, so zeigt sich, daß das Maximum der Ausscheidungssteigerung gegenüber dem des Natriums zeitlich in die zweite Clearanceperiode verschoben ist (siehe Anhang Abb. 21, 22).

Das Serumkalium blieb konstant.

Anorganisches Phosphat

Die bekannte phosphaturische Wirkung des Parathormons zeigt ihr Maximum erst zwischen der 15. und 30. Minute. Bei (A) ergab sich jedoch nur eine Steigerung der Phosphatclearance von 20 auf 30 ml/min. (50%) (siehe Anhang Abb. 21). Hierzu korrelierend sank der Phosphatspiegel im Serum von 4,2 mg% direkt nach PTH Gabe ab und erreichte mit 3,4 mg% in der 30 Minute seinen tiefsten Wert, um sich nach der 60. Minute zwischen 3,5mg% und 3,7 mg% einzustellen (siehe Anhang Abb. 19). Bei (B) fiel die Phosphatclearance bei der Calciuminfusion von 20,5 ml/min. auf 12,5 ml/min. und stieg nach PTH Gabe auf 37 ml/min., also um 200 %. Die zweite PTH Injektion ergab eine Steigerung um nur 70 %, dafür blieb die Ausscheidung jedoch über einen längeren Zeitraum erhöht (siehe Anhang Abb. 22). Im Serum stieg der Phosphatspiegel während der Calciuminfusion von 3,1 mg% auf 3,8 mg% am Ende der Infusion an, jedoch wurde dieser Anstieg nach PTH Gabe analog zu (A) durch ein Wiederabsinken um allerdings nur 0,2 mg% mit Tiefstpunkt nach 30 Minuten unterbrochen. Nach Absetzen der Infusion stieg der Phosphatspiegel kontinuierlich weiter bis auf 4,1 mg% in der 210. Minute. Die zweite PTH Gabe bei Minute 250 bewirkte dann einen Abfall auf 3,7 mg% (siehe Anhang Abb. 20).

Calcium und Magnesium

Bei (A) sank die Calciumclearance nach PTH Gabe auf ca. 16 % des Ausgangswertes, die Magnesiumclearance synchron hierzu auf ca. 18 %. Dieses Minimum wurde erst spät zwischen der 70. und 120. Minute nach Injektion erreicht, bei Versuchsende (240. Minute) war der Ausgangswert noch nicht erreicht (siehe Anhang Abb. 21). Der Calcium-und Magnesium-

spiegel im Serum wies keine signifikanten Änderungen auf. Bei (B) stieg während der Calciuminfusion die Calciumclearance von 0,81 ml/min. auf 3,76 ml/min. vor der ersten Injektion an. Gleichzeitig wurde eine Steigerung der Magnesiumclearance von 5,05 ml/min. auf 6,6 ml/min. registriert. Die PTH Gabe hatte keinen oder nur minimalen senkenden Effekt auf die Calciumclearance, die bis zum Ende der Infusion noch auf 4,51 ml/min. anstieg. Die Magnesiumclearance dagegen fiel nach geringem Weiteranstieg 15 Minuten nach Injektion von 7,19 ml/min. auf 4,29 ml/min. ab und erreichte damit bereits zwischen der 13. und 33. Minute (im Gegensatz zu A) ihr Minimum. Die zweite PTH Gabe bewirkte einen tiefen Abfall der Calciumclearance von 4,36 auf 0,56 ml/min. (13%), der Magnesiumclearance von 6,88 auf 1,64 ml/min. (24%) zwischen 18. und 31. Minute (siehe Anhang Abb. 22). Das Serumcalcium stieg während der Infusion von 4,6 mval/l auf 5,6 mval/l an, danach erfolgte ein Wiederabsinken auf Werte zwischen 5,1 mval/l und 5,2 mval/l bei Versuchsende (siehe Anhang Abb.20). Das Serummagnesium wies nur unwesentliche Schwankungen auf.

Diskussion der Versuche mit Parathormon Injektion

Die in der Literatur angegebenen Werte für die cAMP Ausscheidung im Urin bzw. 24 h-Sammelurin bewegen sich zwischen 1,5 und 5,5 uMol/g Kreatinin unter Basalbedingungen (siehe Tab. 1). Parathormon steigert die renale Produktion des cyclischen Nucleotids cAMP und dessen Ausscheidung im Urin.

Wir fanden nach intravenöser Injektion von 200 USP Parathormon einen Anstieg des Serum-cAMP auf das 2 - 3,5-fache. Dieser Serumanstieg stammt, wie Kaminsky, Broadus et al. (17) als auch Czekalski, Loreau, et al. (84) nachweisen konn-

ten, allein aus der Niere, da er bei nephrektomierten Patienten nicht nachweisbar ist. So kommt es als Ausdruck eines PTH bedingten intrazellulären Anstiegs von cAMP in der Tubuluszelle, wahrscheinlich durch Stimulation der im proximalen Tubulus in der contraluminalen Zellmembran lokalisierten Adenylatcyclase (83), neben einer erhöhten Diffusion in das Tubuluslumen auch zur Regurgitation des Nucleotids in das abführende Gefäßsystem. Die Tatsache, daß PTH auch in seinen anderen Erfolgsorganen, wie Knochen und Darm, den intrazellulären Spiegel an cAMP erhöht, kommt jedoch nicht in einer Änderung des Serumspiegels zum Ausdruck.

Zeitlich synchron zum Anstieg des Nucleotids im Serum kommt es in den ersten 15 Minuten nach PTH Gabe zum abrupten Anstieg der cAMP Ausscheidung im Urin. Bildet man das Verhältnis der Clearances von cAMP : Kreatinin, so zeigt sich (unter der vereinfachenden Voraussetzung, daß Kreatininclearance = GFR) ein Anstieg dieses Quotienten auf 8,9 und 19,4 bzw. 11,4, woraus sich der nephrogene Anteil am gesamten ausgeschiedenen cAMP mit 89 % und 95 % bzw. 91 % ergibt. Dies zeigt, daß allein die renale Produktionssteigerung Ursache der erhöhten Ausscheidung ist. Unter Basalbedingungen beträgt der nephrogene Anteil 20 - 50 %.

Das zeitliche Verhalten der cAMP Spiegel im Plasma und in der Urinausscheidung zeigt nach steilem Anstieg einen ebenso steilen Abfall, wobei nach ca. 15 - 20 Minuten ein Wert oberhalb des Ausgangswertes erreicht wird, der dann plateauartig bis zur 40. Minute bestehen bleibt, um dann erst auf den Ausgangswert abzufallen.

Nahezu synchron zur Bewegung des cAMP kommt es nach PTH

zu einem deutlichen Anstieg der Natriumclearance und des Harnvolumens auf das 2,5 - 7-fache. Dieser Effekt kann demnach als die primäre, durch cAMP direkt vermittelte Wirkung des PTH auf die Nierenfunktion angesehen werden und wird, wie Agus et al. (86, 87) durch Mikropunktionsversuche nachwiesen, durch Hemmung der Natrium Reabsorption am proximalen Tubulus ausgelöst. Den gleichen Effekt erhielt man durch Perfusion des Tubulus mit cAMP selbst, welches also direkt auf den Natrium- und Wassertransport der luminalen Zellmembran Einfluß zu nehmen scheint.

Zeitlich etwas nach der Wirkung auf die Natriumausscheidung und etwas länger andauernd kommt es zu einer Erhöhung der Kaliumclearance, die vielleicht neben der proximalen Reabsorptionshemmung zusätzlich durch eine Aldosteronwirkung am distalen Tubulus bei erhöhtem Natriumdurchfluß verlängert wird. Dies wird besonders deutlich, wenn man die Kaliumausscheidung auf das Kreatinin bezieht (siehe Anhang Tabellen 9 und 10).

Der phosphaturische Effekt des PTH, der wohl bekannteste, tritt später ein, wobei die Phosphatausscheidung erst zwischen der 13. und 30. Minute ihr Maximum erreicht, während das cAMP in Serum und Urin bereits wieder auf den Plateauwert abgefallen ist. Als Ausdruck der Phosphaturie sinkt der Phosphatspiegel im Serum ab und erreicht zwischen 30. und 40. Minute sein Minimum. Dies scheint die Hypothese von Wen (88) zu bestätigen, der im Gegensatz zu Agus et al. (86, 87) unterschiedliche Mechanismen für die Hemmung der Natrium- und Phosphatresorption am proximalen Tubulus annimmt.

Eine weitere zeitliche Verschiebung zeigte sich bei der Ausscheidung von Calcium und Magnesium, die zwar weitge-

hend parallel verlief, jedoch Unterschiede zwischen Proband A und B aufwies. Die Ausscheidung der zweiwertigen Kationen sank nach PTH Gabe kontinuierlich ab und erreichte bei A zwischen der 70. und 120. Minute ihr Minimum, war bei Ende des Versuches nach 240 Minuten aber immer noch deutlich unter den Ausgangswerten. Das zeitlich hiervon verschiedene Verhalten bei B soll weiter unten diskutiert werden.

Über den Mechanismus der Calcium- und Magnesiumausscheidung herrscht noch Uneinigkeit in der Literatur.

Agus et al. (86, 87) fanden durch Mikropunktion, daß die Reabsorption von Calcium im proximalen Tubulus parallel zur Natriumreabsorption durch PTH gehemmt wurde, Calcium dafür aber im distalen Nephron verstärkt (durch PTH stimuliert) resorbiert wurde, was schließlich zum hypocalcämischen Effekt führt. Dies könnte den kurzfristigen Anstieg der Calciumclearance bei A in den ersten 15 Minuten erklären, wenn man annimmt, daß beide Effekte, die proximale Hemmung und die distale Förderung der Reabsorption sich als zeitlich aufeinanderfolgende Vorgänge überlagern. Neuere Untersuchungen von Chabardes et al. (91) zeigen, daß auch Teile des distalen Nephrons eine, wenn auch wesentlich geringere, PTH stimulierbare Adenylatcyclaseaktivität besitzen, was die Untersuchungen von Agus unterstützen könnte. Andere Autoren jedoch fanden keine PTH bedingte Variation der Calciumabsorption am proximalen Tubulus (89), oder aber eine vermehrte proximale Resorption (90).

Ein weiterer Effekt des PTH zeigte sich in einem Anstieg der Kreatininclearance bei beiden Probanden. Ursache dieses Phänomens ist entweder eine Erhöhung der glomerulären

Filtrationsrate (GFR) oder aber eine vermehrte tubuläre Sekretion des Kreatinins unter PTH Einfluß. Kaminsky et al. (17) fanden bei hohen PTH Dosen einen Anstieg der Inulin Clearance um 20 %, die meisten Untersucher jedoch konnten keinen Einfluß von PTH auf die GFR feststellen. Da in unserem Versuch das Clearanceverhältnis cAMP : Kreatinin bis auf 0,8 absank, cAMP jedoch nicht tubulär reabsorbiert wird, muß die Kreatininclearance schon unter Basalbedingungen bei A und B größer als die GFR sein.

Betrachtet man die durch PTH bedingten Änderungen des cAMP im Vergleich zum Auftreten der Veränderungen der anderen Parameter, so fällt auf, daß die Effekte auf das Verhalten von Phosphat, Calcium, Magnesium und Kreatinin erst voll zur Wirkung kommen, nachdem der Effekt auf die cAMP Bildung (zumindest was den Nachweis von cAMP im Extrazellulärraum betrifft) fast vollständig beendet ist; jedenfalls überdauern diese Effekte die primär induzierten cAMP Veränderungen bis zu 240 Minuten. Hieraus könnte man schließen, daß der cAMP Anstieg alle folgenden Reaktionen in Gang setzt, die dann selbständig weiterlaufen, auch wenn das auslösende Moment bereits verschwunden ist. Diese Vorstellung würde dem cAMP über seine Bedeutung als intrazellulärer "second messenger" hinaus auch eine derartige extrazelluläre Rolle zuschreiben.

Calciuminfusion

Die Calciuminfusion bei (B) ließ den Calciumspiegel im Serum von 4,6 mval/l auf 5,6 mval/l am Ende der Infusion ansteigen, was zur vollständigen Suppression der endogenen PTH Sekretion geführt haben müßte (siehe Anhang Abb. 20). Murad und Pak (24) fanden bei schon geringerer Calciumzufuhr eine Suppression des endogenen radioimmunolo-

gisch bestimmten PTH über 24 Stunden.

Als Ausdruck der Hemmung der endogenen PTH Sekretion fiel bei (B) die cAMP Ausscheidung um 40 % bis vor B1 und nach vorübergehender Erhöhung durch die PTH Injektion weiter (siehe Anhang Tabelle 8), um vor B2 50 % des Ausgangswertes zu erreichen (1,45 uMol/g Kreatinin). Im Serum änderte sich am cAMP Spiegel wenig, doch sank er nach der PTH Gabe doch noch auf seinen tiefsten Wert von 9,6 nM in der 210. Minute ab (siehe Anhang Abb. 22).

Daß in unserem Versuch die Suppression über die Beendigung der Infusion hinaus wirksam war, zeigt ebenfalls der kontinuierliche Weiteranstieg des anorganischen Phosphates im Serum bis zur 210. Minute durch Hemmung des phosphaturischen PTH Effektes. Ergänzend dazu kam es zu einem Abfall der Phosphatclearance um 40 % in den ersten 70 Minuten (siehe Anhang Abb. 20 und Tabelle 10). Auch die Zunahme der Magnesiumclearance ist auf eine Hemmung der endogenen Parathormonsekretion zurückzuführen, da PTH ja die Magnesiumausscheidung vermindern würde (siehe Anhang Abb. 22 und Tabelle 10).

Der fehlende Abfall der Calciumclearance bei B1 ist sicher auf die Überlagerung des PTH bedingten hypocalcurischen Effekts von der, durch die Calciuminfusion bedingten, Mehrausscheidung an Calcium zurückzuführen. Daß die Magnesiumclearance bereits nach 63 Minuten wieder ansteigt (bei (A) Minimum zwischen 70. und 120. Minute), könnte durch die wahrscheinlich hohen Calcitoninspiegel, die während und nach der Calciuminfusion zu erwarten sind, erklärt werden: Calcitonin (CT) wirkt zu PTH antagonistisch in Bezug auf die zweiwertigen Kationen, was den gegenüber (A) früher erfolgenden Wiederanstieg der Clearances bewirken könnte. CT

wirkt jedoch ebenso wie PTH phosphaturisch; als Ausdruck dessen könnte der Wiederanstieg der Phosphatclearance vor der zweiten PTH Injektion gedeutet werden. CT hat keinen Einfluß auf die Ausscheidung von cAMP (17, 24).

Führt man eine Bilanzierung des Calciumhaushaltes während der Infusion durch, so ergibt sich unter der Annahme, daß die Extrazellulärflüssigkeit (EZF) mit ca. 20 % des Körpergewichts bei ungefähr 14 Litern anzunehmen ist und daß sich Calcium im gesamten EZF gleich verteilt, folgende Bilanz:

Calcium

zugeführt in Infusion gesamt 5 g	= 249,5	mVal = 100 %
Anstieg in EZF um 1 mval/l	= 14	mVal
Mehrausscheidung im Urin (gegenüber Vorperiode)	= 2,09	mVal
	16,09	mVal = 6,45 %

Hieraus ergibt sich, daß über 93 % des zugeführten Calciums sofort dem mobilen Pool entzogen und in das Skelett gespeichert bzw. eingebaut werden.

Vergleicht man die Effekte der PTH Gabe von A und B1 (vgl. Abb. 16, 17, 21, 22 und siehe Anhang Tabellen 8, 9 und 10), so fällt auf, daß die Urinausscheidung von cAMP bei B1 ungefähr doppelt so hoch ansteigt wie bei A, obwohl die Wirkung auf die Ausscheidung von Natrium, Kalium und Wasser ähnlich sind. Allerdings stieg die unter Calciuminfusion supprimierte Phosphatclearance bei B1 nach PTH Gabe um 200%, während sie bei A vom höheren Ausgangswert um nur 50 % anstieg. Die maximal erreichten Clearancewerte waren aber nahezu gleich.

Bei einem Vergleich der Wirkung der zweiten PTH Gabe (B2) mit der ersten (B1) fällt neben einem wesentlich ge-

ringerem Serumanstieg von cAMP bei B2 (15,2 - 32,3 nM) gegenüber B1 (15,3 - 51,3 nM) eine um den gleichen Faktor niedrigere Urinausscheidung auf. Der Serumspiegel bei B2 kehrte bereits in der 12. Minute zum Ausgangswert zurück (B1 erst nach 30 - 40 Minuten). Die Phosphatclearance stieg um 70 % auf ungefähr den gleichen Maximalwert wie bei B1. Erstaunlicherweise war das Ausmaß des Effektes von B2 auf die Natrium-, Kalium- und Wasserausscheidung trotzdem mit dem von B1 identisch. Der Einfluß auf die Verminderung der Calcium- und Magnesiumausscheidung war sogar ausgeprägter als bei B1. Es scheint also keine direkte Korrelation zwischen der Höhe des cAMP Anstiegs nach PTH in Serum und Urin und den Veränderungen der anderen gemessenen Parameter zu bestehen. Folgende andere Untersuchungsergebnisse weisen ebenfalls auf diesen Sachverhalt hin bzw. könnten mit ihm in Verbindung stehen:

Kaminsky et al. (17) fanden bei Verabreichung von steigenden PTH Dosen einen dosisabhängigen Anstieg der cAMP und Phosphatausscheidung, wobei die Phosphatelimination bereits bei niedrigeren Dosen ein Maximum zeigte, während die cAMP Exkretion dosisabhängig weiter stieg. Die limitierenden Faktoren der cAMP Bildung scheinen also von denen der sekundären Hormonwirkungen verschieden zu sein. Dies steht durchaus im Einklang mit der Theorie des "Triggermechanismus" der cAMP Wirkung.

Czekalski et al. (84) fanden bei Probanden, deren Urin pH durch Bikarbonatinfusionen über 7 gehoben wurde, eine Steigerung der cAMP Ausscheidung um 50 % durch eine Erhöhung des nephrogenen cAMP bei gleichbleibenden Serumspiegeln. Ebenso fanden sie nach PTH Gabe unter diesen Bedingungen eine stärkere Erhöhung des Serumspiegels und der Urinausscheidung von cAMP als ohne Bikarbonatinfusion.

Als Erklärung hierfür nehmen sie eine erleichterte Diffusion des nichtionisierten cAMP von der Tubuluszelle in den Extrazellulärraum an, in dem bei alkalischem Milieu die ionisierte Form stark überwiegt (pK_a cAMP 4,15). Es fand sich eine signifikante Korrelation zwischen cAMP und Bikarbonatausscheidung.

Rupprecht und Guder (92) wiesen bei Untersuchungen an isolierten Tubuluszellen der Ratte eine Hemmung des PTH bedingten intrazellulären Anstiegs von cAMP um 50 % durch α -adrenerge Stimuli nach. α -Adrenergika sind in der Lage, die proximale Natriumreabsorption antagonistisch zum PTH zu erhöhen (93). So wäre es denkbar, daß die cAMP Exkretion auch durch die gerade herrschende Catecholaminaktivität modifiziert werden könnte.

Für das unterschiedliche Ansprechen der cAMP Bildung bei gleicher PTH Dosis könnten also mehrere Ursachen diskutiert werden. Eventuell besteht bei B2 noch eine gewisse "Refraktärität" gegen die überphysiologischen Dosen aus der ersten Hormongabe, wobei jedoch der geringere Anstieg des "Triggers" bereits ausreicht, die gleichen Folgereaktionen hervorzurufen.

Eine weitergehende Erörterung würde jedoch bei der nur zwei Probanden umfassenden Untersuchung zu weit führen und muß späteren Untersuchungen vorbehalten werden.

Z u s a m m e n f a s s u n g

Die Entdeckung des cyclischen Adenosin 3'-5'-monophosphats (cAMP) als intrazellulärer Informationsüberträger hormoneller Signale in verschiedenen Organismen begründete eine neue Ära der Erforschung von Hormonwirkung und -regulation (siehe Einleitung). Nachdem cAMP auch in den Extrazellulärflüssigkeiten nachgewiesen werden konnte und sich zeigte, daß durch die Wirkung bestimmter Hormone die extrazellulären cAMP Konzentrationen, die sonst geringen Schwankungen unterworfen sind, verändert wurden (siehe II,1), richtete sich auch das Interesse der klinisch-chemischen Analytik auf die Messung von cAMP. Eine Voraussetzung war die Erstellung von Normwerten und die Entwicklung rationeller, präziser Meßmethoden (siehe II, 3 und 4), da die cyclischen Nukleotide un extrem niedrigen Konzentrationen im Extrazellulärraum vorliegen (siehe Seite 16 Tabelle 1) .

Anliegen dieser Arbeit war die Entwicklung einer rationalen Meßmethode für cAMP mit ausreichender Präzision und Richtigkeit für die klinisch-chemische Forschung, die Erstellung von Normwerten und die Anwendung der Methode für klinische Fragestellungen. So ergab sich die Aufteilung der Untersuchung in einen methodischen und einen klinischen Teil.

Von verschiedenen bereits bekannten Meßmethoden (siehe II, 4 Seite 18) wählte ich das von Gilman et al (61) entwickelte Prinzip als das für den beabsichtigten Zweck am besten geeignete aus. (siehe Seite 22) Es beruht auf der Bestimmung der Konzentration des cAMP durch selektive Bindung an ein in verschiedenen Geweben vorkommendes Enzym, die Proteinkinase, und Konkurrenz des cAMP mit ^3H markiertem cAMP um die Bindungsstelle im Sinne eines kompetitiven Isotopenverdünnungstests.

Das hierzu notwendige Bindungsprotein (Proteinkinase) präparierte ich aus Rinderherzmuskel (siehe III, A1, Seite 23) und erhielt nach einem sechs Schritte umfassenden Verfahren (Tabelle 2, Seite 24) und ca. 400-facher Anreicherung ein Enzym von hoher spezifischer Bindungsaktivität und Selektivität für cAMP.

Die Optimierung des Testvorganges erforderte einige Modifikationen der von Gilman angegebenen Methode (siehe III, A2). Die Auswertung der im Bindungstest erzielten Eichkurven gelang am besten in der speziellen Auftragung des "single reciprocal plot" (Abbildung 7 a und b, Seite 36 und 37), wobei ich eine vollständige Linearisierung der in der Normalauftragung hyperbelähnlichen Eichkurven erzielen konnte. Damit wurde die Auswertung der Messung in einem selbst erstellten Computerprogramm (basic program) möglich.

Die Abtrennung des an das Protein gebundenen cAMP vom "freien" cAMP wird analog zum Vorgehen nach Gilman durch Adsorption des Proteins an einen Filter erreicht. Versuche mit anderen Trennungsmethoden, wie Synthese eines sedimentierbaren Sepharose-Protein Komplexes oder Adsorption des "freien" cAMP an Aktivkohle, ergaben weniger gute Ergebnisse und wurden verlassen (siehe III, A4).

Nachdem die Erstellung von Eichkurven und die Messung im Urin gute Ergebnisse gebracht hatte, ergaben sich bei Messungen im Blutplasma erhebliche Schwierigkeiten durch das Auftreten von Faktoren, die die Bindungskapazität des cAMP-Proteinkinase-Systems veränderten (siehe III, A6). Ein Faktor (dialysabel), der die Bindung an die Proteinkinase hemmt und ein zweiter (nicht dialysabel), der die Affinität des Proteins für cAMP erhöht. Letzterer erwies sich als resistent gegenüber starker Erhitzung und Ausfällung mit verschiedensten organischen Lösungen. Zur Charakterisierung führten wir eine Präparation des nicht dialysablen Faktors durch, die

zu einer 231-fachen Anreicherung des Serumfaktors führte und die Untersuchung seiner Eigenschaften ermöglichte (Einzelheiten siehe III, A6, Seite 47).

Bei Verwendung einer Bindungsproteinpräparation geringeren Reinheitsgrades und geringer spezifischer Aktivität erwies sich der Faktor jedoch als unwirksam und ich konnte bei Verwendung dieses Proteins die Standardisierung der Serummessung vornehmen. Nachdem ich sowohl die Präzision als auch Richtigkeit der Serummessung von cAMP nachweisen konnte, wurde die Erstellung von Normalwerten an grösseren Kollektiven möglich. (siehe III, A7 und 8). Nach Überwindung dieser methodischen Probleme konnte ich zur Anwendung der Messung von cAMP in Plasma und Urin übergehen.

Parathormon ist in der Lage, den Plasmaspiegel und besonders die Urinausscheidung von cAMP durch Stimulierung der Adenylatcyclase in den proximalen Nierentubuli zu erhöhen. Meine Untersuchung über Plasmakonzentration und renale Ausscheidung von cAMP bei chronischen Hämodialyspatienten (siehe III, B1, Seite 65) ging der Frage nach, inwieweit die manifestierte Überfunktion der Nebenschilddrüsen bei diesen Patienten durch Abweichungen der cAMP-Plasmaspiegel und Urinausscheidungen vom Normbereich objektivierbar ist.

Die 24 h Urinausscheidung betrug bei den chronisch Niereninsuffizienten nur 1/10 bis 1/100 der normalen Ausscheidung trotz nachgewiesener erhöhter Parathormonspiegel. (siehe Anhang Tabelle 5-7) Hierfür ist nicht nur die Einschränkung der glomerulären Filtrationsrate sondern auch die tubuläre Funktionsstörung verantwortlich, die die PTH bedingte cAMP Bildung in proximalen Tubulus reduziert. Die Einschränkung der renalen Ausscheidung von cAMP war somit vom Grad der Diurese unabhängig, sodaß sogar Patienten, die sich in der polyurischen Phase des Nierenversagen befanden, stark reduzierte cAMP Ausscheidungen aufwiesen.

An den Plasmaspiegeln von cAMP war eine Überfunktion der Nebenschilddrüse nicht ablesbar, was durch den Ausfall des renalen PTH Receptors erklärbar wäre. Die Dialyse führte zu einem weiteren Absinken der bereits reduzierten renalen cAMP Ausscheidung, was durch eine Suppression der erhöhten PTH Aktivität erklärt werden kann.

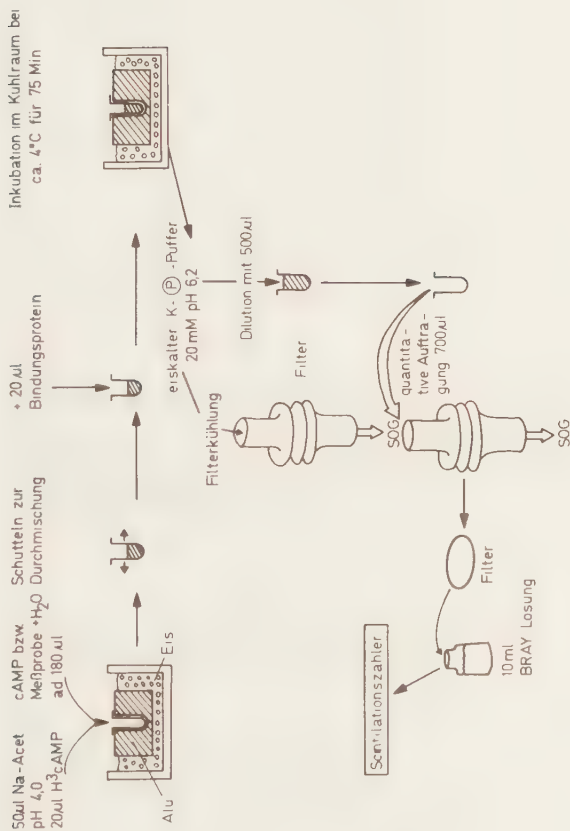
Injektionsversuche von Parathormon (PTH) bei zwei gesunden Probanden (siehe III B2, Seite 72) wurden vorgenommen, und in kurzen Intervallen Blut- und Urinproben entnommen, um den zeitlichen Ablauf der Hormonwirkung studieren zu können. Ferner erhielt ein Proband eine Calciuminfusion vor der Injektion des Hormons. Bestimmt wurden cAMP, die Elektrolyte Natrium, Kalium, Calcium und Magnesium, sowie Kreatinin und Urinvolumen.

PTH bewirkt, wie erwartet, eine Steigerung der Urinausscheidung von cAMP auf das 40-80 fache, nach 30 Minuten war der Effekt nicht mehr nachweisbar. Im Plasma erfolgt ebenfalls ein Anstieg auf das 3-4fache des Ausgangswertes mit Maximum in der 7. - 9. Minute. Eine Calciuminfusion bewirkt ein Absinken der cAMP Urinausscheidung als Ausdruck einer Hemmung der endogenen PTH Sekretion. (Anhang Tabelle 8 und Abbildung 21 und 22) Parallel zur Kinetik des cAMP kam es nach PTH Injektion zu einem deutlichen Anstieg der Natriumclearance und des Harnvolumens. Dieser Effekt kann als die primäre, direkt durch cAMP vermittelte Wirkung des PTH auf die Nierenfunktion angesehen werden.

Erstaunlicherweise lassen sich die bekannten anderen Wirkungen auf die Nierenfunktion erst nachweisen, nachdem der Effekt auf die cAMP Bildung (zumindest im Extrazellulärraum nachweisbar) fast nicht mehr vorhanden ist: Die Erhöhung der Phosphatclearance mit Maximum 13. - 30. Minute; das Absinken der Calcium - und Magnesiumclearance

mit Minimum sogar erst zwischen der 70. und 120. Minute. Diese Latenzzeit findet wohl ihre Erklärung im Mechanismus der durch cAMP vermittelten sekundären Hormonwirkungen. (siehe Abbildung 1, Seite 3 und Anhang Abbildung 21 und 22).

PIPETTIERSCHEMA



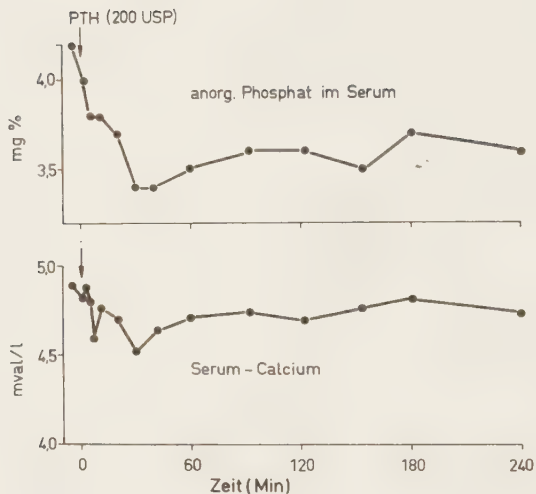


Abb. 19

Verhalten der Serumspiegel von anorgan. Phosphat und Calcium nach intravenöser Gabe von 200 USP PTH bei Proband A.

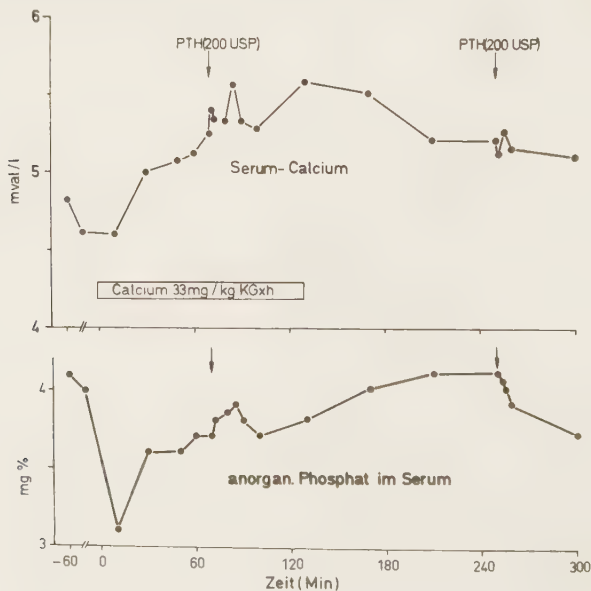


Abb. 20

Verhalten der Serumspiegel des Calciums und des anorg. Phosphats während der Calciuminfusion und nach zweimaliger intravenöser Gabe von 200 USP PTH bei Proband B. Einzelheiten siehe Text.

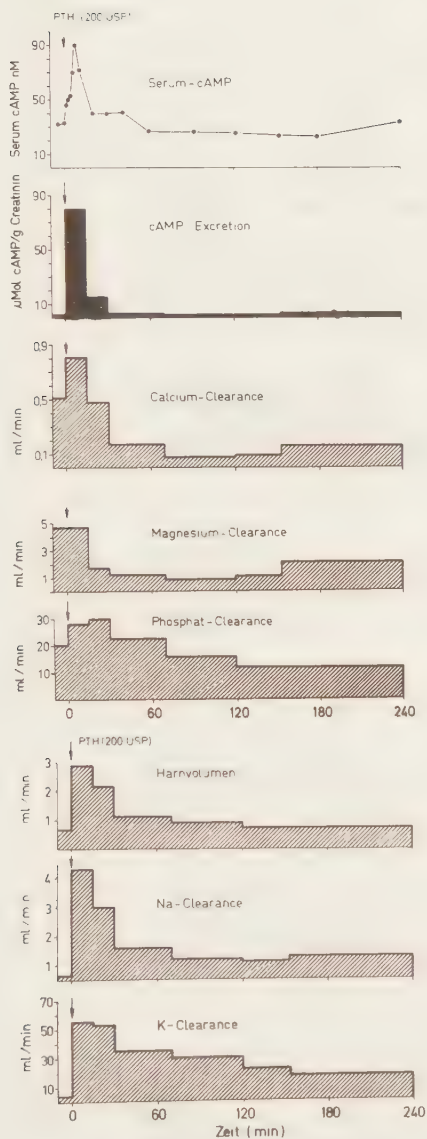


Abb. 21

Wirkung einer intravenösen Gabe von 200 USP PTH bei Proband A auf Harnvolumen und renale Clearance von Na, K, Ca, Mg und Phosphat und zeitliche Beziehung der Veränderungen zur Wirkung auf cAMP in Serum und Urin.

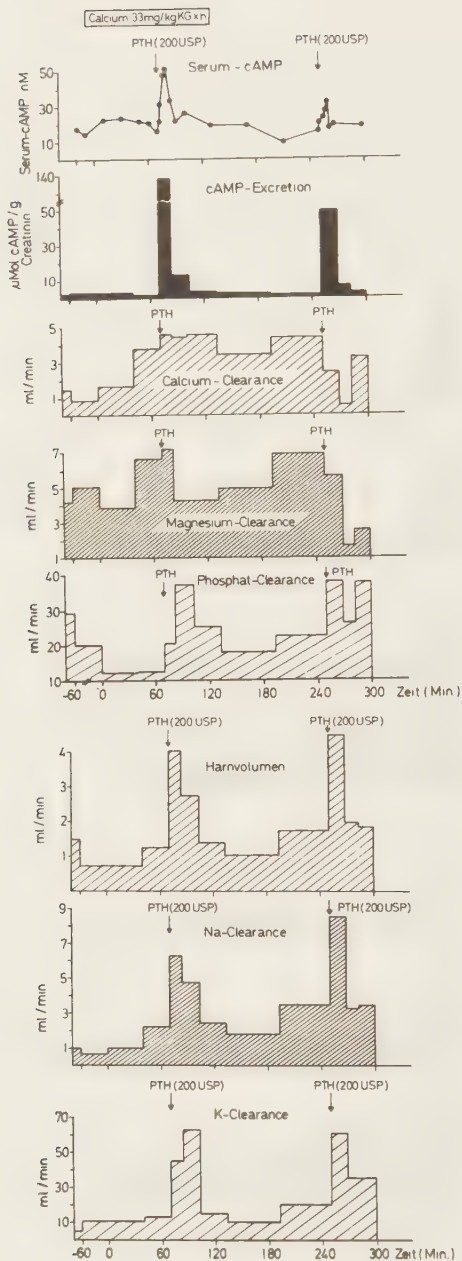


Abb. 22

Wirkung der Calciuminfusion und der zweimaligen intravenösen Gabe von je 200 USP PTH bei Proband B auf Harnvolumen und renale Clearance von Na, K, Ca, Mg und Phosphat und zeitliche Beziehung der Veränderungen zur Wirkung auf cAMP in Serum und Urin. Einzelheiten siehe Text!

Tabelle 5

Beziehung zwischen ausgeschiedenem Urinvolumen und Serumkonzentrationen bzw. 24-h-Ausscheidungen

Patient	24h Harn- volumen	Serum-cAMP nMol/l	24h-Urin-cAMP uMol/24h	Serum-Ca mVal/l	24h-Urin-Ca mVal/24h	Serum-P mg/100ml	24h-Urin-P mg/24h
<u>Oligurische Gruppe A</u>							
III	25 ml	35,5	0,0266	4,91	0,033	5,8	3,3
I	100 ml	28,5	0,0213	4,61	0,294	7,0	17,4
<u>Oligurische Gruppe B</u>							
VII	400 ml	--	0,039	--	0,312	--	46,8
XII	500 ml	14,4	0,044	4,42	0,585	8,2	75,0
XIV	700 ml	9,9	0,153	4,46	0,21	5,6	117,6
II	950 ml	10,8	0,144	4,82	0,399	9,2	179,6
<u>Polyurische Gruppe</u>							
VI	1100 ml	13,7	0,279	4,19	0,99	6,1	323,4
XIII	1500 ml	15,4	0,570	4,53	1,44	8,0	396,0
IX	1800 ml	16,9	0,667	4,76	0,972	6,4	129,6
VIII	2000 ml	17,3	0,178	5,0	0,9	6,9	378,0
V	2990 ml	9,7	0,221	4,91	1,88	4,8	385,7

Bei VII Verlust von Serum A₁

Tabelle 6

Vergleich von Urinvolumen und renaler Clearance von cAMP, Kreatinin, Calcium und anorganischem Phosphat bei chronischen Hämodialysepatienten

Patient	24h Harn- volumen	cAMP-Clearance	Kreatinin-Clear.	Clear.ratio cAMP : Kreat.	Ca-Clearance	P-Clearance
<u>Oligurische Gruppe A</u>						
III I	25 ml	0,5 ml/min	0,05 ml/min	10	0,005 ml/min	0,04 ml/min
	100 ml	0,52 ml/min	0,156 ml/min	3,3	0,044 ml/min	0,173 ml/min
<u>Oligurische Gruppe B</u>						
XII XIV II	500 ml	2,13 ml/min	0,78 ml/min	2,7	0,092 ml/min	0,64 ml/min
	700 ml	10,75 ml/min	1,85 ml/min	5,7	0,033 ml/min	1,46 ml/min
	950 ml	9,29 ml/min	1,60 ml/min	5,8	0,057 ml/min	1,36 ml/min
<u>Polyurische Gruppe</u>						
VI XIII IX VIII V	1100 ml	14,16 ml/min	6,70 ml/min	2,1	0,164 ml/min	3,68 ml/min
	1500 ml	25,7 ml/min	4,39 ml/min	5,8	0,220 ml/min	3,44 ml/min
	1800 ml	2,74 ml/min	2,19 ml/min	1,3	0,142 ml/min	1,40 ml/min
	2000 ml	7,15 ml/min	3,57 ml/min	2,0	0,125 ml/min	3,90 ml/min
	2990 ml	15,84 ml/min	8,20 ml/min	1,9	0,312 ml/min	5,58 ml/min

(Bei IV Verlust von Urin B₁, bei VII von Serum A₁)

Tabelle 7

Veränderungen von cAMP Serumspiegeln und Urinausscheidungen während Hämodialyse

Patient	Serum cAMP (nMol/l)			Urinvolumen (ml)		uMol/24h		cAMP Urinausscheidung uMol/6h		uMol/g Kreatinin	
	A ₁	A ₂	A ₃	B ₁	B ₂	B ₁	B ₂	B ₁	B ₂	B ₁	B ₂
I	28,5	32,5	52,3	100	55	0,0213	0,0005	0,63	0,007	0,63	0,007
II	10,8	11,2	17,7	950	80	0,144	0,0032	0,49	0,035	0,49	0,035
III	35,5	33,9	30,3	25	10	0,0266	0,0118	1,03	0,63	1,03	0,63
IV	15,1	10,0	13,3	--	20	--	0,0588	--	--	1,34	--
V	9,7	12,7	19,5	2990	--	0,221	--	0,25	--	--	--
VI	13,7	14,4	12,0	1100	110	0,279	0,0163	0,38	0,12	0,38	0,12
VII	--	18,6	30,3	400	15	0,039	0,0132	0,35	0,75	0,35	0,75
VIII	17,3	8,4	18,4	2000	85	0,178	n.d.	0,29	n.d.	0,29	n.d.
IX	16,9	13,1	12,0	1800	80	0,067	n.d.	0,15	n.d.	0,15	n.d.
XI	--	17,1	33,0	--	10	--	0,0101	--	0,59	--	0,59
XII	14,4	15,4	20,3	500	100	0,044	n.d.	0,34	n.d.	0,34	n.d.
XIII	15,4	11,2	10,0	1500	70	0,570	0,0314	0,60	0,30	0,60	0,30
XIV	9,9	11,4	11,5	700	75	0,153	n.d.	0,43	n.d.	0,43	n.d.

Die Ergebnisse sind das Mittel von Doppelwerten.

Bezeichnung A₁, A₂, A₃ und B₁ und B₂ siehe unter "Methoden"

n.d. = non detectable

Tabelle 8
cAMP Ausscheidung und Clearance Verhältnis cAMP : Kreatinin

PROBANT A				PROBANT B			
Zeit (Min.)	cAMP uMol/g Kreat.	Clear.ratio cAMP : Kreat.		Zeit (Min.)	cAMP uMol/g Kreat.	Clear.ratio cAMP : Kreat.	
720	1,97	0,8		-60 - 0	2,88	1,46	Ca ⁺² Inf.
0 - 15	79,7	8,9	← PTH	0 - 40	2,21	0,83	
15 - 30	15,4	3,87		40 - 70	1,72	0,84	
30 - 70	3,1	0,93		70 - 83	138	19,4	← PTH
70 - 120	2,6	0,93		83 - 103	13,1	3,8	
120 - 153	2,56	0,94		103 - 133	3,1	1,1	
153 - 240	3,0	0,86		133 - 195	2,16	0,79	Ca ⁺² Stop
				195 - 250	1,45	0,82	
				250 - 268	49,1	11,4	← PTH
				268 - 281	6,32	2,5	
				281 - 295	4,26	1,7	

Zur Darstellung siehe Abb. 16 und 17

Tabelle 9

Clearances der gemessenen Parameter in ml/min.

PROBAND A

Zeit (Min.)	Na	Harnvol.	K	K/Kreat.	Ca	Mg	Phosphat	Kreatinin
720 - 0	0,63	0,65	3,94	36,8	0,51	4,69	19,9	107
P T H								
0 - 15	4,3 ⁺	2,87 ⁺	55,15	287	0,81	4,67	28	192
15 - 30	3,0	2,13	54,3	390 ⁺	0,48	1,68	29,8 ⁺	139
30 - 70	1,6	1,08	35	267	0,17	1,19	22,5	131
70 - 120	1,2	0,9	30	225	0,08 ⁺	0,86 ⁺	16	133
120 - 153	1,14	0,7	22,1	216	0,09	1,1	11,8	102
153 - 240	1,3	0,7	16,8	159	0,16	2,08	11,7	106

Bei K/Kreatinin : $\times 10^{-3}$ Maximale Wirkung bei ⁺

Zur Darstellung siehe Abb. 18 und 21

Tabelle 10

Clearances der gemessenen Parameter in ml/Minute

PROBAND B

Zeit (Min.)	Na	Harn- vol.	K	K/Kreat.	Ca	Mg	Phosphat	Phos/ Kreat.	Kreatinin
-60 - 0	0,64	0,72	10,8	47	0,81	5,05	20,5	89	230
0 - 40	0,95	0,73	10,7	64	1,62	3,83	12,3	73	167
40 - 70	2,2	1,26	13,3	69	3,76	6,6	12,5	64	193
P T H									
70 - 83	6,3 ⁺	4,08 ⁺	45,5	192 ⁺	4,51	7,19	20,5	86 ⁺	237
83 - 103	4,76	2,75	63,2 ⁺	254 ⁺	4,46	4,29	37 ⁺	149 ⁺	249
103 - 133	2,45	1,4	15,5	82	4,54	4,27	25,3	134	189
133 - 195	1,79	1,08	10,3	66	3,42	4,9	18,1	115	157
195 - 250	3,49	1,76	20,3	93	4,36	6,88	22,6	104	217
P T H									
250 - 268	8,56 ⁺	4,55 ⁺	61,7 ⁺	211 ⁺	2,38 ⁺	5,68	38,2 ⁺	130	292
268 - 281	3,3	2,0	35,6	252 ⁺	0,56 ⁺	1,64 ⁺	26,1	185 ⁺	141
281 - 295	3,5	1,85	35,7	181	3,23	2,53	37,8	192 ⁺	197

Bei K/Kreatinin und Phosphat/Kreatinin : $\times 10^{-3}$

Der Quotient wurde nur angegeben, wenn dies eine zeitliche Verschiebung der maximalen Wirkung aufzeigte.

Maximale Wirkung bei +

Calciuminfusion erfolgte von Zeitpunkt 0 bis 133 Minuten ($33 \text{ mg Ca}^{+2}/\text{kg KG x h}$).

Zur Darstellung siehe Abb. 18 und 22!

LITERATUR

- (1) Levine, R., Goldstein, M.S., Klein, S., Huddleston, B., J.Biol.Chem. 179 (1949), 985
- (2) Rall, T.W. & Sutherland, E.W., J. Biol.Chem. 232 (1958), 1065
- (3) Gonzales, C.: M.S. Thesis, University of Washington (1962)
- (4) Posner, J.B., Stera, R. & Krebs, E.G. (1965 J.Biol.Chem. 240, 982 - 985
- (5) Appleman, M.M., Birnbaumer, L. & Torres, H.N. (1966) Arch.Biochem.Biophys. 116, 39
- (6) Walsh, D.A., Ashby, C.D., Conzaes, C., Calkins, D., Fischer, E.H. & Krebs, E.G. (1971) J.Biol.Chem. 246, 1977-1985
- (7) Ashby, C.D. & Walsh, D.A. (1972) J.Biol.Chem. 247, 6637 - 6642
- (8) Donnelly, T.E.jr., Kuo, I.F., Reyes, P.L., Liu, Y.P. & Greengard, P. (1973) J.Biol.Chem. 248, 190
- (9) Förster, H., Mehnert, H.: Kohlehydratstoffwechsel in Siegenthaler, W.: Klin.Pathophysiologie (Stuttgart 1970)
- (10) Murad, F., Rak, T.W. & Vaughan, M. (1969) Biochem.Biophys. Acta 192, 430
- (11) Robinson, G.A., Butcher, R.W. & Sutherland, E.W. (1971) Cyclic Amp. Academic Press, New York - London
- (12) Davoren, P.R. & Sutherland, E.W. (1963) J.Biol.Chem 238, 3009
- (13) Marinetti, G.V., Ray, T.K. & Tomase, V. (1969) Biochem.Biophys.Res.Comm. 36, 185
- (14) Bitensky, M.W., Russel, V. & Robertson, W. (1968) Biochem.Biophys.Res.Comm. 31, 706
- (15) Exton, J.H., Robinson, G.A., Sutherland, E.W. & Park, C.R. (1969) J.Biol.Chem. 244, 215
- (16) George, W.J., Polson, J.B., O'Toole, A.G. & Goldberg, W.D. Proc.Nat.Acad.Sci.U.S.A. 66 (1970) 398
- (17) Kaminski, N.J., Broadus, A.E., Hardman, J.G. et al. (1970) J.Clin.Invest. 49, 2387 - 2395
- (18) Butcher, R.W. & Sutherland, E.W. (1962) J.Biol.Chem. 237, 1244

- (19) Case, L.R. & Aurbach, G.D.
(1967) Proc.Nat.Acad.Sci.U.S.A. 58, 518
- (20) Chase, L.R., Melson, G.L. & Aurbach, G.D.
(1969) J.Clin.Invest. 48, 1832 - 1844
- (21) Estep, H., Fratkin, M., Moser, A. & Robinson, F.
(1970) Clin.Res. 18, 358
- (22) Taylor, A.L., Davis, B.B., Paulson, L.G. et.al.
(1970) J.Clin.Endocrin.Metab. 30, 316 - 324
- (23) Williams, R.H., Barish, J. & Ensinnck, J.W.
(1972) Proc.Soc.Exp.Biol.Med. 139, 447 - 454
- (24) Murad, F. & Pak, C.Y.C.
(1972) N.Engl.J.Med. 286, 1382 - 1387
- (25) Schultz, G., Jakobs, K.H., Böhme, E. & Schultz, K.
(1972) Eur.J.Biochem. 24, 520 - 529
- (26) Fichman, M.P. & Brooker, G.
(1972) J.Clin.Endocrinol.Metab. 35, 35 - 47
- (27) Broadus, A.E., Kaminsky, N.I., Hardman, J.G. et al.
(1970) J.Clin.Invest. 49, 2237 - 2245
- (28) Ball, J.H., Kaminsky, N.I., Hardman, J.G. et al.
(1972) J.Clin.Invest. 51, 2124 - 2129
- (29) Yamashita, K. & Field, J.B.
(1972) J.Biol.Chem. 247, 7062 - 7066
- (30) Beck, N.P., Reed, S.W., Murdaugh, H.V. & Davis, B.B.
(1972) J.Clin.Invest. 51, 939 - 944
- (31) Hardman, J.G., Davis, J.W. & Sutherland, E.W.
(1969) J.Biol.Chem. 244, 6354 - 6362
- (32) Beck, N.P., De Rubertis, F.R., Michaelis, M.F. et al.
(1970) J.Lab.Clin.Med. 76, 1005
- (33) Butcher, R.W., Baird, C.E.
(1968) J.Biol.Chem. 243, 1713
- (34) Sagel, J., Collwell, J.A., Loadholt, C.B.
(1973) J.Clin.Endocrin.Metab. 37, 570 - 573
- (35) Broadus, A.E., Kaminsky, N.I., Hardman, J.G. et al.
(1970) J.Clin.Invest. 49, 2222 - 2236
- (36) Blonde, L., Wehmann, R.E., Steiner, A.L.
(1974) J.Clin.Invest. 53, 163 - 172
- (37) Wehmann, R.E., Blonde, L., Steiner, A.L. et al.
(1974) J.Clin.Invest. 53, 173 - 179
- (38) Rall, T.W. & Sutherland, E.W.
(1958) J.Biol.Chem. 232, 1065
- (39) Breckenridge, B. McL
(1964) Proc.Nat.Acad.Sci.U.S.A. 52, 1580

- (40) Goldberg, N.D. Larner, J., Sasko, H. & O'Toole, A.G.
(1969) Anal.Biochem. 28, 523 - 544
- (41) Aurbach, G.D. & Houston, B.A.
(1968) J.Biol.Chem. 243, 5935
- (42) Greengard, P. & Robison, G.A.
(1972) Adv.Cycl.Nukleotid Research, vol. 1,2
Raven Press, New York
- (43) Ebadi, M.S., Wess, B. & Costa, E.
(1970) Science 170, 188 - 190
- (44) Johnson, R.A., Hardman, J.G., Broadus, A.E. & Sutherland, E. W.
(1970) Anal. Biochem 35, 91
- (45) Brooker, G., Thomas, L.J. & Appleman, M.M.
(1968) Biochemistry 7, 4177 - 4182
- (46) Brooker, G., (1970) Anal. Biochem. 42, 1108 - 1110
- (47) Steiner, A.L., Pagliara, A.S., Chase, L.R. & Kipnis, D.M.,
(1972) J.Biol.Chem. 247, 1114 - 1120
- (48) Steiner, A.L., Parker, C.W. & Kipnis, D.M.
(1970) Advanc.Biochem.Psychopharm. vol. 1
Raven Press, New York
- (49) Steiner, A.L., Kipnis, D.M., Utiger, R. & Parker, C.
(1969) Proc.Nat.Acad.Sci.U.S.A. 64, 367
- (50) Steiner, A.L., Parker, C.W. & Kipnis, D.M.
(1972) J.Biol.Chem. 247, 1106 - 1113
- (51) Yalow, R.S. & Berson, A.S.
(1960) J.Clin.Invest. 39, 1157
- (52) Kuo, J.F. & Greengard, P.
(1970) J.Biol.Chem. 245, 4067 - 4073
- (53) Wastila, W.B., Stull, J.T., Mayer, S.E. & Walsh, D.A.
(1971) J.Biol.Chem. 246, 1996 - 2003
- (54) Butcher, F.R., (1971) Horm.Metab.Res. 3, 336 - 340
- (55) Kuo, J.F., Lee, T.P., Reyes, P.L. et al.
(1972) J.Biol.Chem. 247, 16 - 22
- (56) Castagna, M., (1970) FEBS Letters 8, 289 - 292
- (57) Gerbitz, K.D. & Wieland, O.
unveröffentlichte Beobachtungen
- (58) Breckenridge, B. McL.
(1971) Ann.N.Y.Acad.Sci. 185, 10 - 17
- (59) Walton, G.M. & Garren, L.D.
(1970) Biochemistry 9, 4223 - 4229

- (60) Gilman, A.G., (1970) Proc.Nat.Acad.Sci.U.S.A. 67,
305 - 312
- (61) Brown, B.L., Albano, J.D.M., Ekins, R.P., Sgherzi,
A.M. & Tampion, W.
(1971) Biochem.J.121, 561 - 562
- (62) Miyamoto, E., Kuo, J.F. & Greengard, P.
(1969) J.Biol.Chem. 244, 6395 - 6402
- (63) Rubin, C.S., Ehrlichmann, J. & Rosen, O.M.
(1972) J.Biol.Chem. 247, 36 - 44
- (64) Tao, M., Salas, H.L. & Lippmann, F.
(1970) Proc.Nat.Acad.Sci. 67, 408
- (65) Gilman, A.G., (1972) Advances in Cycl.Nukl.Res.vol.2
- (66) Rodbard, D., Bridson, W. & Rayford, P.L.
(1969) J.Lab.Clin.Med. 74, 770
- (67) Wombacher, H. & Körber, F.
(1972) Zeitschr.Klin.Chem.Klin.Biochem. 10, 260 - 266
- (68) Weller, M., Rodnight, R. & Carrera, D.
(1972) Biochem.J. 129, 113 - 121
- (69) Fisch, H.U., Pliska, V. & Schwyzer, R.
(1972) Eur.J.Biochem. 30, 1-6
- (70) Rabinowitz & Katz
(1973) Clinical Chemistry vol. 19 No. 3, 312 - 314
- (71) Tsang, C.P.W., Lehotay, D.C. & Murphy, B.E.P.
(1972) J.Clin.Endocrinol.Metab. 35, 809 - 817
- (72) Butler, D. & Jord, S.
(1972) Pflügers Archiv 331, 172 - 190
- (73) Cramer, H., NG, L.K.J. & Chase, T.N.
(1972) J.Neurochem. 19, 1601
- (74) Johns, E.W., (1964) Biochem.J. 92, 55
- (75) Ramachandran, J.
(1971) Anal.Biochem. 43, 227 - 239
- (76) Paul, M.I., Ditzion, B.R., Pauk, G.L. & Janowsky, D.S.
(1970) Amer.J.Psychiatr. 126, 1493
- (77) Abdullah, Y.H. & Hamadah, K.
(1970) Lancet I, 378 - 381
- (78) Dohan, P.H., Yamashita, K., Larsen, P.R., Davis, B. et al.
(1972) J.Clin.Endocrinol.Metab. 35, 775 - 784
- (79) Aurbach, G.D., Marcus, R., Winickoff, R.N. et al.
(1970) Metab.Clin.Exp. 19, 799 - 808
- (80) Murad, F. & Pak, C.Y.C., Abstract in p-583 in l.c. (42)

- (81) Linarelli, L.G., Abstract p. 580 in l.c. (42)
- (82) Bernstein, R.A., Linarelli, L., Facktor, M.A.
Friday, G.A., Drash, A.L. & Fireman, P.
(1972) J.Lab.Clin.Med. 80, 772 - 779
- (83) R. Kinne, E. Kinne-Safran
(1975) Current Problems in Clin.Biochemie 4, 218-222
- (84) Czekalski, S., Loreau, N., Paillard, F. et al.
(1974) Europ.J.Clin.Invest. 4, 85 - 92
- (85) Schmidt-Gayk, H., Röher, H.D., Seybert, H.W.
(1973) Chirurg 44, Springer Verlag
- (86) Agus, Z.S., Gardner, L.B., Beck, L.H., Goldberg, M.
(1973) Am.J.Physiol. 224, 1138 - 1148
- (87) Agus, Z.S., Puschett, J.B., Senesky, D., Goldberg, M.
(1971) J.Clin.Invest. 50, 617 - 626
- (88) Wen, S.F., (1974) J.Clin.Invest. 53, 143 - 153
- (89) Frick, A., Rumrich, G., Ulrich, K.J., Lassiter, W.E.
(1965) Arch.Ges.Physiol. 286, 109 - 117
- (90) Buerkert, Markus, J.D., Jamison, R.
(1972) J.Clin.Invest. 51, 17 a
- (91) Chabardes, D., Imbert, M. Clique, A. et.al.
(1975) Plügers Archiv 354, 229 - 239
- (92) Guder, G.W. & Rupperecht, A.
(1975) Pflügers Archiv 354, 177 - 186
- (93) Gill, J.R. & Casper, A.G.T.
(1972) Amer.J.Physiol. 223, 1201 - 1205
- (94) Hardman, J.G. & Sutherland, E.W.
(1969) J.Biol.Chem. 244, 6363
- (95) White, A.A. & Aurbach, G.D.
(1969) Biochem.Biophy.Acta 191 : 686
- (96) Böhme, E., (1970) Eur.J.Biochem. 14, 422
- (97) Mahaffe, D.B., Watson, B. & Ney, R.L.
(1970) Clin.Res. 18, 73
- (98) Robison, G.A., Butcher, R.W., Sutherland, E.W.
(1968) Cyclic AMP, Annu.Rev.Biochem. 37, 149

Danksagung

Die vorliegende Arbeit konnte nur durch die Unterstützung und mit Beratung von Herrn Prof. Dr. O. Wieland entstehen. Hierfür möchte ich ihm meinen besonderen Dank aussprechen.

Dank gebührt weiterhin vor allem Herrn Dr. K. Gerbitz, der mir mit Rat und Tat zur Seite stand und dessen Anregungen sich fruchtbar auf die Entwicklung der Untersuchung auswirkten. Für seine oft in Anspruch genommene Hilfe danke ich von Herzen.

Herrn Dr. Siess möchte ich für die Hilfe bei der Erstellung eines Computerprogrammes, das die Rationalisierung der Messungen stark voran getrieben hatte, meinen Dank aussprechen.

Ferner danke ich Fräulein B. Lübben für ihre ausgezeichnete technische Hilfe und allen, die durch Ratschläge, Diskussion und Kritik den Umfang dieser Arbeit vermehrt haben.

Fritz Jänicke

Lebenslauf

Name: Jänicke
Vorname: Fritz Karl Heinz
geboren am 19. 4. 1948
in Berlin-Weißensee
Vater: Dr. med. Karl Heinz Jänicke
gestorben 11. 7. 1971
Mutter: Brigitte Jänicke, geb. ABmus

Schulausbildung:

1954 - 1956 Grundschule Berlin-Weißensee
1956 - 1958 Holländische Grundschule in Indonesien
1958 - 1959 Grundschule Lindau/Bodensee
1959 - 1968 Bodensee Gymnasium Lindau/Bodensee

Studium:

1968 - 1970 Universität Freiburg, Humanmedizin
1970 - 1972 Universität Kiel, Humanmedizin
1972 - 1975 Universität München, Humanmedizin
WS 1974/1975 Staatsexamen
März 75 - Juni 76 Medizinalassistent
Juni 1976 Approbation

